

DANILLO GARDENAL AUGUSTO

DIVERSIDADE DE GENES *KIR* EM UMA POPULAÇÃO DE ASCENDÊNCIA
PREDOMINANTEMENTE EUROPÉIA

CURITIBA
2010

DANILLO GARDENAL AUGUSTO

DIVERSIDADE DE GENES *KIR* EM UMA POPULAÇÃO DE ASCENDÊNCIA
PREDOMINANTEMENTE EUROPÉIA

Dissertação entregue à banca avaliadora para
obtenção do título de mestre, pelo Programa de
Pós-Graduação em Genética, da Universidade
Federal do Paraná, sob orientação da Professora
Dra. Maria Luiza Petzl-Erler.

CURITIBA
2010

Agradecimentos

À professora Luiza, pela orientação diária, amizade, confiança e por acreditar nos seus orientados. Por nos dar exemplo de competência, honestidade e perseverança. Por amar o que faz e deixar isso refletir a cada dia, em cada conversa, cada conselho, reunião de laboratório e cada novo projeto. Acima de tudo, por se preocupar com que nossa formação seja completa.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana, com quem divido grande parte do meu tempo, trabalho, festas, frustrações... Nada teria sentido sem vocês.

Aos professores do Departamento de Genética, por compartilhar o conhecimento e serem grandes amigos. Em especial, ao Iglénir Cavalli, por nos mostrar que o verdadeiro conhecimento está fundamentado numa base sólida e que esse é o diferencial daqueles que vão além.

A todos os funcionários do departamento, nas suas mais variadas funções, contribuindo com a limpeza, com os cafezinhos, correspondências, secretaria e SEAD.

Aos membros da comissão avaliadora, pelas sugestões, críticas e elogios.

Aos meus amigos que convivem comigo e que torcem por mim e que estão dispostos a ajudar mesmo quando não são solicitados.

Aos meus pais, por estarem comigo em todos os momentos importantes da minha vida. É uma honra compartilhá-los com vocês.

A todos os alunos e ex-alunos do PPGGen, por fazer do departamento um local agradável.

À Taynah Vicari, por verdadeiramente “segurar as pontas” na representação discente, nos momentos em que eu estava desesperadamente correndo contra os prazos!

Ao Daniel Gunzel, por estar do meu lado, mesmo que longe, em momentos difíceis.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária, pela bolsa, auxílios e financiamento do projeto de pesquisa.

"O acaso só favorece a mente preparada."
Louis Pasteur

SUMÁRIO

SUMÁRIO	1
2 CÉLULAS NK E SEUS RECEPTORES	9
2.1 NATURAL KILLER: UMA CÉLULA ESPECIAL.....	9
2.2 AÇÃO CITOTÓXICA DOS LINFÓCITOS NO EXTERMÍNIO DE CÉLULAS INFECTADAS E NEOPLÁSICAS	9
2.3 REPERTÓRIO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE DAS NK.....	10
2.4 GENES DOS RECEPTORES DAS NK: DOIS GRUPOS DISTINTOS	13
2.5 NOMENCLATURA <i>KIR</i>	13
2.7 DIVERSIDADE ALÉLICA.....	22
2.8 IMUNOGENÉTICA DOS RECEPTORES DAS CÉLULAS NK.....	22
2.9 ASPECTOS EVOLUTIVOS.....	24
2.10 O PAPEL DAS CÉLULAS NK NA AUTOIMUNIDADE	24
3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	27
4.2 COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA	28
4.3 GENOTIPAGEM.....	28
4.4 ANÁLISE DE PERFIS	30
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS.....	34
5.1 FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>KIR</i>	34
5.2 COMPARAÇÕES ENTRE POPULAÇÕES	34
5.3 DELEÇÃO DE 22PB EM <i>2DS4</i>	37
5.4 PERFIS <i>KIR</i> E FREQUÊNCIA DE HAPLOGRUPOS.....	37
5.5 INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS	41
5.6 DISTÂNCIAS GENÉTICAS.....	41
5.7 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	41
5.8 LIGANTES HLA	46
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXPRESSÃO CLONAL DE GENES KIR.	11
FIGURA 2 - GENES DOS RECEPTORES NK DAS REGIÕES NKC E LRC:	14
FIGURA 3 - INTERAÇÕES ENTRE RECEPTORES INIBIDORES E ATIVADORES COM MHC CLASSE I.....	15
FIGURA 4 - INTERAÇÃO DOS GENES DO NKC E LRC COM O MHC E MOLÉCULAS RELACIONADAS.	16
FIGURA 5 - ESTRUTURA E NOMENCLATURA DE MOLÉCULAS KIR.	17
FIGURA 6 - ORDEM DE GENES DE DOIS HAPLÓTIPOS DE GENES KIR COMPLETOS.	20
FIGURA 7 - DIVERSOS HAPLÓTIPOS DOS GENES KIR, COM BASE NO CONTEÚDO GÊNICO	21
FIGURA 8 – DISTÂNCIAS GENÉTICAS ESTIMADAS PELO MÉTODO DE NEI.	43
FIGURA 9 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE PARES DE GENES <i>KIR</i>	45

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - RECEPTORES ATIVADORES E INIBIDORES DAS CÉLULAS NK. (RAULET, 2004)	12
TABELA 2 – PROTOCOLO DA PCR-SSP	29
TABELA 3 – LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (UHRBERG ET AL., 1997)	30
TABELA 4 – FREQUÊNCIAS DOS GENES KIR	35
TABELA 5 – MAIOR HETEROGENEIDADE DE FREQUÊNCIAS DE <i>2DL3</i> ENTRE CURITIBA E OUTRAS POPULAÇÕES EUROPÉIAS OU EURO-DESCENDENTES.	36
TABELA 6 – COMPARAÇÕES ENTRE A AMOSTRA POPULACIONAL DE CURITIBA E OUTRAS POPULAÇÕES PARA TODO O CONJUNTO DE GENES KIR E PARA OS SUBCONJUNTOS DE GENES INIBIDORES E ATIVADORES.	38
TABELA 7 – FREQUÊNCIAS DOS GRUPOS ALÉLICOS FUNCIONAL E NÃO FUNCIONAL DE <i>2DS4</i>	39
TABELA 8 – PERFIS GÊNICOS (FENÓTIPOS) ENCONTRADOS EM CURITIBA	40
TABELA 9 – POSSÍVEIS HAPLÓTIPOS PRESENTES NA AMOSTRA POPULACIONAL DE CURITIBA.	42
TABELA 10 – POPULAÇÕES DO DENDROGRAMA.....	44
TABELA 11 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE LIGANTES HLA.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFNs	Interferons
IGSF	Receptores semelhantes a imunoglobulinas
IL	Interleucina
ITAM	Motivos ativadores baseados em tirosina
ITIM	Motivos inibidores baseados em tirosina
GVHD	Doença do enxerto contra o hospedeiro
KIR	Receptores das assassinas naturais semelhantes a imunoglobulinas
LCT	Linfócitos T citotóxicos
LRC	Complexo dos receptores leucocitários
NK	Células Natural Killer, assassinas ou exterminadoras naturais
NKC	Complexo <i>Natural Killer</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
TNF	Fator de necrose tumoral

RESUMO

As células exterminadoras naturais (assassinas naturais, *natural killer* ou NK), que têm grande importância na imunidade inata agindo como primeira linha de defesa, apresentam receptores de membrana ativadores e inibidores que reconhecem moléculas MHC de classe I. Uma família desses receptores, chamados KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), é codificada por um agrupamento de genes localizado, em humanos, no cromossomo 19q13.4, uma região genômica alterada por recentes expansões e contrações. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade dos genes *KIR* em uma população Euro-brasileira, compará-la com outras populações já estudadas e analisar os variantes *KIR* no contexto de suas relações com seus ligantes HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) conhecidos, verificando se há alguma correlação de frequências entre *KIR* e alelos *HLA*. Genes *KIR* são bons marcadores genéticos e estudos de populações podem ajudar a compreender os mecanismos envolvidos na rápida evolução do complexo. Além disso, há evidências de que as frequências dos genes *KIR* podem ser influenciadas por fatores exógenos, e possivelmente isso é relacionado com a interação parasita-hospedeiro, uma hipótese de seleção natural a ser testada. Foram genotipados 153 indivíduos de ancestralidade predominantemente europeia da região de Curitiba, utilizando o método PCR-SSP seguida de corrida eletroforética em gel de agarose 3%. Observamos que as frequências dos genes *KIR* inibidores foram mais elevadas e homogêneas que as frequências dos genes ativadores. Exceto *2DL5* (51,9%), todos os genes *KIR* inibidores foram encontrados com frequência de presença de pelo menos 59% (*2DL2*) até 100% (*3DL2* e *3DL3*), similar às de outras populações de ascendência europeia. Com exceção do gene *2DS4*, nenhum outro gene ativador de cauda curta (*2DS* ou *3DS*) atingiu frequência de presença superior a 60%. A amostra de Curitiba apresentou vários genes cujas frequências diferiram de forma estatisticamente significantes em comparação com as das amostras populacionais africana e asiática. Estimamos que 54% dos indivíduos apresentam em ao menos um cromossomo um alelo funcional do gene *KIR2DS4*, enquanto 75% apresentam em ao menos um cromossomo um alelo não funcional. Os perfis fenotípicos mais frequentes foram os mesmos encontrados em alta frequência em populações europeias e realizamos inferência haplotípica. A partir do cálculo de distâncias genéticas, construímos um

dendograma com 59 populações de diferentes regiões geográficas, que mostra semelhança entre as populações européias e euro-descendentes. O padrão de desequilíbrio de ligação entre genes *KIR* foi analisado, mostrando forte desequilíbrio entre alguns genes. Também analisamos alguns ligantes HLA conhecidos (HLA-A, -B e -C). Homozigotos *C1/C1* corresponderam a 43,8% enquanto os genótipos *C1/C2* e *C2/C2* foram encontrados em frequências de 27,0% e 29,2% respectivamente. Homozigotos *Bw4* representaram 15,9% e heterozigotos representaram 42,8% dos indivíduos testados. Nós chamamos de ligantes funcionais aqueles cujos receptores *KIR* estão presentes no indivíduo. Assim, se um indivíduo tem 2DL2, mas não 2DL1 e possui ambos os ligantes C1 e C2, esse tem apenas um ligante funcional (C1), em vista da ausência do receptor para C2, 2DL1, nesse indivíduo. A população em estudo apresentou uma média de 3,2 ligantes funcionais por indivíduo e cada indivíduo tem ao menos dois ligantes funcionais. Todos os ligantes e seus respectivos receptores tiveram suas frequências distribuídas independentemente. Dos indivíduos que apresentaram ausência de Bw4 de HLA-B, 45% apresentaram Bw4 de HLA-A. Portanto, esses dois genes provavelmente são igualmente importantes na função de reconhecimento por parte das células NK. Estudos populacionais não somente fornecem o fundamento para estudos evolutivos, mas também podem ajudar para a compreensão da variação normal desses genes, o que poderá servir como base para outros estudos. Podem colaborar na compreensão de como a ausência ou presença de certos receptores *KIR* e de combinações KIR-HLA contribuem para a patogênese de doenças complexas.

Palavras-chave: receptores semelhantes a imunoglobulinas; *KIR*; MHC classe I; frequências gênicas, genética de populações humanas; população brasileira.

ABSTRACT

The killer immunoglobulin-like receptors (KIR) interact with class I HLA molecules for recognition of targets by natural killer (NK) cells as well as NK cell 'licensing'. The polymorphic *KIR* gene complex includes varying numbers of inhibitory and activating receptors. This study aimed to characterize *KIR* genetic diversity in a Brazilian population and to compare it with other populations. The joint distribution of *KIR* genes and their known HLA ligands was also analyzed to search for evidences of co-evolution. We studied a population of predominantly European ancestry from Curitiba, Paraná State, Brazil (n=153) for 14 *KIR* genes and the *2DP1* pseudogene. Comparisons with other 59 worldwide populations showed consistency of the *KIR* gene frequency distribution with geography and ancestry. Inhibitory genes usually were more frequent and more similar between populations than activating genes. The studied population was similar to European and other Euro-descendant populations, but as an admixed population, showed higher genetic diversity. We found 27 KIR profiles, many of them uncommon in European populations, in agreement with the historically recent high gene flow in the study populations. The Bw4 epitope was seen at similar frequency in both the *HLA-A* and *-B* loci, such that both these genes seemingly contribute equally with ligands for the 3DL1/S1 receptors. None of the analyzed individuals lacked functional KIR receptor-HLA ligand combinations. The frequencies of KIR receptors and respective HLA ligands were distributed independently, a result compatible with low or absent selection pressure on *KIR-HLA* combinations.

Key words: killer cell immunoglobulin-like receptors; KIR; MHC class I; gene frequencies; population genetics; Brazilian population.

1 INTRODUÇÃO

As células exterminadoras naturais (assassinas naturais, *natural killer* ou NK), que têm grande importância na imunidade inata agindo como primeira linha de defesa, apresentam receptores de membrana ativadores e inibidores que reconhecem moléculas MHC de classe I (YOKOYAMA, 1998; COLUCCI, DI SANTO e LEIBSON, 2002). Uma família desses receptores, chamados KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), é codificada por um agrupamento de genes localizado, em humanos, no cromossomo 19q13.4 (DUPONT, SELVAKUMAR e STEFFENS, 1997; SELVAKUMAR et al., 1997), uma região genômica alterada por recentes expansões e contrações (UHRBERG, 2005; MARTINEZ-BORRA e KHAKOO, 2008).

O interesse pelo estudo da família *KIR* tem aumentado nos últimos anos, havendo estudos realizados em vários países. Amostras populacionais da Argentina (FLORES et al., 2007), Irlanda do Norte (MIDDLETON, MEENAGH e GOURRAUD, 2007) e outras populações européias ou euro-descendentes (UHRBERG, PARHAM e WERNET, 2002; DENIS et al., 2005; DU et al., 2007) já foram analisadas, mostrando similaridade entre essas populações. Por outro lado, amostras populacionais de africanos (NORMAN et al., 2002; DENIS et al., 2005), aborígenes australianos, vietnamitas (TONEVA et al., 2001), chineses (JIANG et al., 2005), japoneses (YAWATA et al., 2002) e ameríndios (GENDZEKHADZE ET AL., 2006; GUTIERREZ-RODRIGUEZ ET AL., 2006; FLORES ET AL., 2007) são diferentes em relação às frequências dos genes *KIR*, revelando diferenças entre continentes. Três genes (*2DL4*, *3DL2* e *3DL3*) e um pseudogene (*3DPI*) definem a organização geral dos haplótipos *KIR*, delimitando as regiões centromérica e telomérica. São, por isso, chamados de genes moldura (do inglês *framework genes*) e estão presentes em praticamente todos os indivíduos já analisados. Os genes inibidores apresentaram maior homogeneidade de distribuição e frequências mais elevadas que aquelas encontradas para genes ativadores. Há pouca informação a respeito das frequências desses genes em populações brasileiras, sendo que apenas uma amostra populacional de Belo Horizonte já foi caracterizada (MIDDLETON et al., 2008) e pouco se sabe a respeito desses genes em populações ameríndias.

Dois grupos de haplótipos foram descritos, A e B. O haplogrupo A normalmente apresenta sete genes *KIR* inibidores (*3DL2*, *2DL3*, *2DL1*, *2DL4*, *3DL1*, *2DS4* e *3DL2*) sendo *2DS4* o único ativador de cauda curta. Interessantemente, *2DS4* possui um grupo de cinco alelos não funcionais, caracterizados por uma deleção de 22pb (MAXWELL et al., 2002). O haplogrupo B compreende haplótipos com vários genes ativadores de cauda curta (*2DS1*, *2DS2*, *2DS3* e *2DS5*), além do gene inibidor *2DL2*, todos esses genes estão em uma grande quantidade de combinações (UHRBERG et al., 1997; UHRBERG, PARHAM e WERNET, 2002). Todos os alelos de genes *KIR* já descritos estão catalogados no banco de dados on-line IPD KIR-Database (ROBINSON et al., 2003). Aproximadamente 300 perfis (fenótipos moleculares) *KIR* já foram encontrados em 78 populações estudadas, todos catalogados on-line no banco de dados do Allele frequencies.net (MIDDLETON et al., 2003).

A presença ou ausência de certos genes *KIR*, bem como diferentes combinações de genes *KIR* e ligantes HLA, já foram associadas a várias doenças (KHAKOO e CARRINGTON, 2006; JIAO et al., 2008; LEVINSON et al., 2008). Além disso, há evidências de co-evolução de genes *KIR* e ligantes HLA (SINGLE et al., 2007). Certas moléculas HLA de classe I já foram claramente definidas como ligantes *KIR*: o receptor inibidor *2DL1* liga-se a moléculas HLA-C do grupo C2, um conjunto moléculas com lisina na posição 80 da cadeia pesada; receptores *2DL2* e *2DL3* ligam-se, por sua vez, às moléculas do grupo C1, que apresentam asparagina nessa mesma posição. O receptor *3DL1* reconhece um subconjunto de moléculas HLA-A ou -B que apresentam o motivo sorológico Bw4 (revisado por KHAKOO e CARRINGTON, 2006). Foi verificado que o receptor *3DL1* é inibido mais fortemente pelo subconjunto de moléculas Bw4 que apresenta isoleucina na posição 80 (CELLA et al., 1994; CARR, PANDO e PARHAM, 2005).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade dos genes *KIR* em uma população Euro-brasileira, compará-la com outras populações já estudadas e analisar as variantes *KIR* no contexto de suas relações com seus ligantes HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) conhecidos, verificando se há alguma correlação de frequências entre *KIR* e alelos *HLA*. Genes *KIR* são bons marcadores genéticos e estudos de populações podem ajudar a compreender os mecanismos envolvidos na rápida evolução do complexo. Além disso, há evidências de que as frequências dos genes *KIR* podem ser influenciadas por fatores exógenos, e possivelmente isso é relacionado com a interação parasita-hospedeiro, uma hipótese de seleção natural a ser testada (KULKARNI et al., 2008).

2 CÉLULAS NK E SEUS RECEPTORES

2.1 NATURAL KILLER: UMA CÉLULA ESPECIAL

As células NK são linfócitos derivados da medula óssea, muitos dos quais exibem morfologia granular. São encontradas no sangue periférico, compreendendo aproximadamente 15% dos linfócitos periféricos e também são vistos em certos tecidos, como placenta, fígado e cavidade peritoneal. Células NK provenientes de roedores e humanos compartilham muitas funções e características, mas diferem na expressão de suas moléculas da superfície (BIRON et al., 1999; BIRON e BROSSAY, 2001).

Além de fundamental importância da função das células NK para a eliminação de células neoplásicas e infectadas, essas células estão também relacionadas à doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD) nos transplantes de medula óssea e regulação da hematopoiese. Estudos recentes sugerem que as NK podem conduzir e/ou direcionar respostas imunes adaptativas (FLODSTROM et al., 2002).

Elas são ativadas por citocinas pró-inflamatórias como interferons tipo I (INFs) e interleucinas-12 (IL-12) (WARREN, 1996), ou ainda por dinucleotídeos citosina-guanina não metilados de origem bacteriana (BALLAS, RASMUSSEN e KRIEG, 1996). Essa ativação acentua a citotoxicidade das NK e a produção de citocinas. As células NK utilizam vários mecanismos indutores de apoptose, como perforinas, granzimas e fatores de necrose tumoral (TNF), para lisar as células alvo de maneira rápida e precisa (FLODSTROM et al., 2002).

2.2 AÇÃO CITOTÓXICA DOS LINFÓCITOS NO EXTERMÍNIO DE CÉLULAS INFECTADAS E NEOPLÁSICAS

As moléculas HLA de classe I clássicas (HLA-A, -B e -C) são expressas na superfície da maioria das células do corpo e são reconhecidas por pelo menos dois tipos celulares distintos: linfócitos T citotóxicos (CTL) e as células NK. Durante uma infecção viral, as moléculas de classe I apresentam peptídeos virais aos receptores das células T. Na presença de sinais co-estimuladores, é desencadeada uma série de sinais que resultam na ativação dos CTLs, que exterminarão as células infectadas

(ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1974). Já as células NK possuem receptores ativadores e inibidores que, em conjunto, modulam sua ação exterminadora.

Quando moléculas HLA de classe I ligam-se aos seus receptores inibidores específicos nas células NK, são gerados sinais inibidores que neutralizam os sinais ativadores das células NK, garantindo dessa forma, a sobrevivência das células normais do organismo. Portanto, a expressão de moléculas HLA garante a identificação das células saudáveis e a inibição do ataque por NK. Porém, muitas infecções virais e tumores regulam negativamente a expressão de moléculas HLA. A diminuição ou ausência de expressão das moléculas HLA impedem a geração de sinais inibidores nas células NK, que destruirão as células infectadas ou neoplásicas (BIRON et al., 1999). Se houver reconhecimento de sinal específico por receptores ativadores devido a produtos de células infectadas ou neoplásicas, essas também serão mortas por células NK. Dessa forma, os linfócitos T citotóxicos e as células NK são dois importantíssimos efetores das respostas a infecções e anormalidades.

2.3 REPERTÓRIO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE DAS NK

Muitos são os receptores das células NK (TABELA 1), mas um detalhe importante é a forma como eles são expressos. Cada célula NK expressa um conjunto diferente de receptores que reconhecem moléculas do MHC (FIGURA 1). O processo que a célula utiliza para ativar a co-expressão de um subconjunto de genes codificantes de receptores parece ser inicialmente aleatório (RAULET, VANCE e MCMAHON, 2001). Dessa forma, nem todas as células NK do organismo apresentam os mesmos receptores, podendo cada clone ser específico para certos locais ou tecidos e cada um desses clones ser mais ou menos reativo a determinados patógenos ou outras anormalidades.

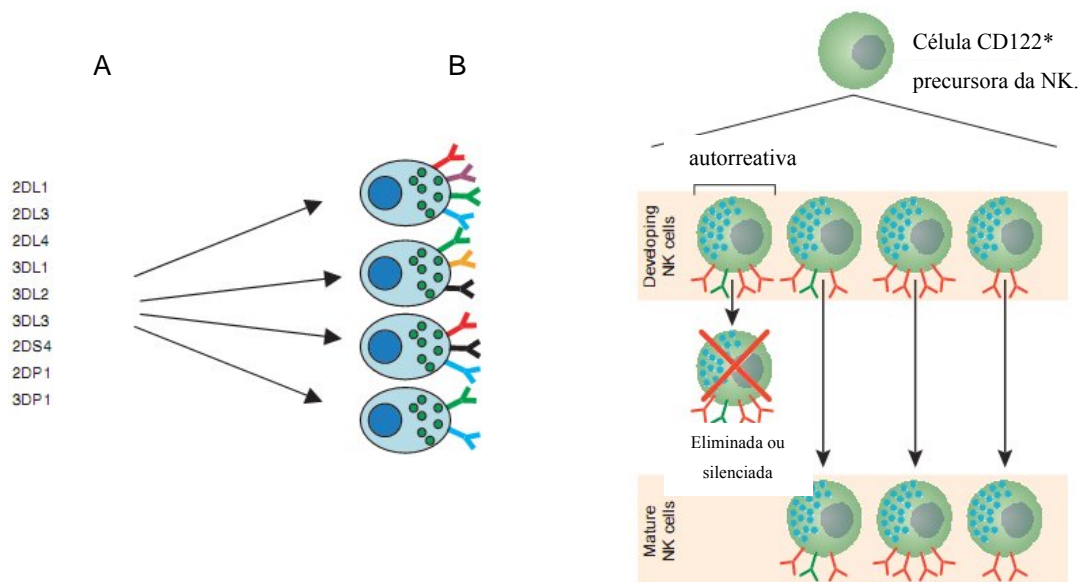


FIGURA 1 – EXPRESSÃO CLONAL DE GENES KIR.

A – SÃO MOSTRADAS QUATRO CÉLULAS DE UM ÚNICO INDIVÍDUO. A EXPRESSÃO CLONAL GERA CÉLULAS NK COM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE RECEPTORES. B – A ALEATORIEDADE PODE GERAR CÉLULAS AUTORREATIVAS QUE DEVEM SER ELIMINADAS. RECEPTORES ATIVADORES SÃO MOSTRADOS EM COR VERDE E INIBIDORES EM VERMELHO. (WILLIAMS, BATEMAN E KHAKOO, 2005).

TABELA 1 - RECEPTORES ATIVADORES E INIBIDORES DAS CÉLULAS NK.
(RAULET, 2004)

ATIVADORES	INIBIDORES
NKp30	NKG2A
NKp44	LILRB2/LIR1/ILT2
NKp46	KIR2DL
NKp80/KLRF1	KIR3DL
KIR2DS	SIGLEC7/p75/AIRM
KIR3DS1	CEACAM1
NKG2D	LAIR-1
NKG2C	MAFA
NKG2E	
CD16	
CD160	
NTB-A	
CD266 (DNAM-1)	
CD96 (TACTILE)	
CD244 (2B4)	

2.4 GENES DOS RECEPTORES DAS NK: DOIS GRUPOS DISTINTOS

Os genes que codificam os receptores das células NK estão agrupados principalmente em dois cromossomos distintos (FIGURA 2). No cromossomo 12 estão localizados os genes *CD94* e *NKG2*, que são os genes dos receptores semelhantes à lectina tipo C e estão presentes em uma região de aproximadamente 2 Mb na região genômica 12p13.1, no *Natural Killer Complex* (NKC) (BROWN et al., 2001).

No cromossomo 19, na região 19q13.4, está o *Leukocyte Receptor Complex* (LRC) que compreende mais de 25 genes oriundos de seguidas duplicações (WILSON et al., 2000) pertencentes à superfamília das imunoglobulinas.

A detecção dos alvos celulares pelas células NK é mediada por receptores pertencentes a duas superfamílias: os receptores semelhantes à imunoglobulina (*IgSF*) e os receptores semelhantes à lectina tipo C, que podem contribuir com sinais inibidores e/ou ativadores. A função efetora desses receptores é controlada por seqüências em caudas citoplasmáticas e na porção transmembrânica (VELY e VIVIER, 1997). Moléculas com função inibidora possuem motivos inibidores baseados em tirosina – ITIMs (LONG, 1999) – e as moléculas com potencial ativador apresentam motivos ativadores baseados em tirosina – ITAMs (ISAKOV, 1998). Os receptores, seus ligantes e motivos baseados em tirosina estão representados na FIGURA 3.

São conhecidos os ligantes específicos de alguns receptores das células NK, mas muitos deles ainda são desconhecidos. As interações ligante/receptor conhecidas foram mostradas na FIGURA 4.

2.5 NOMENCLATURA *KIR*

A nomenclatura dos genes *KIR* (LONG, COLONNA e LANIER, 1996) é baseada no número de domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina (dois ou três) e no tamanho da cauda citoplasmática, sendo L para caudas longas (do inglês, *long*) e S para caudas curtas (do inglês, *short*) (FIGURA 5). De modo geral, moléculas *KIR* que possuem caudas longas promovem sinais inibidores enquanto os receptores de caudas curtas promovem sinais ativadores (PARHAM, 2005). *KIR2DL4* excepcionalmente promove ambos os sinais inibidor e ativador (KIKUCHI-MAKI et al., 2003). A diversidade alélica foi observada para a maioria dos genes *KIR* e os nomes dos alelos são baseados na nomenclatura utilizada para locos *HLA*.

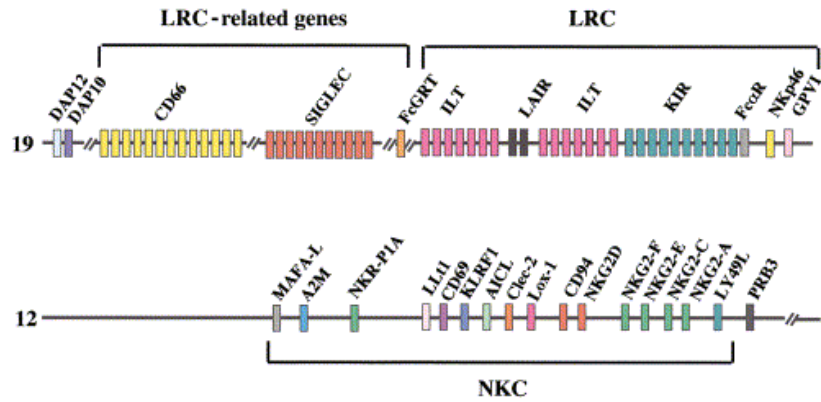


FIGURA 2 - GENES DOS RECEPTORES NK DAS REGIÕES NKC E LRC: APENAS GENES QUE CODIFICAM MOLÉCULAS SEMELHANTES À LECTINA E IMUNOGLOBULINA SÃO MOSTRADOS. TRATA-SE DE UMA FIGURA ILUSTRATIVA E O MAPA NÃO POSSUI ESCALA (TROWSDALE, 2001).

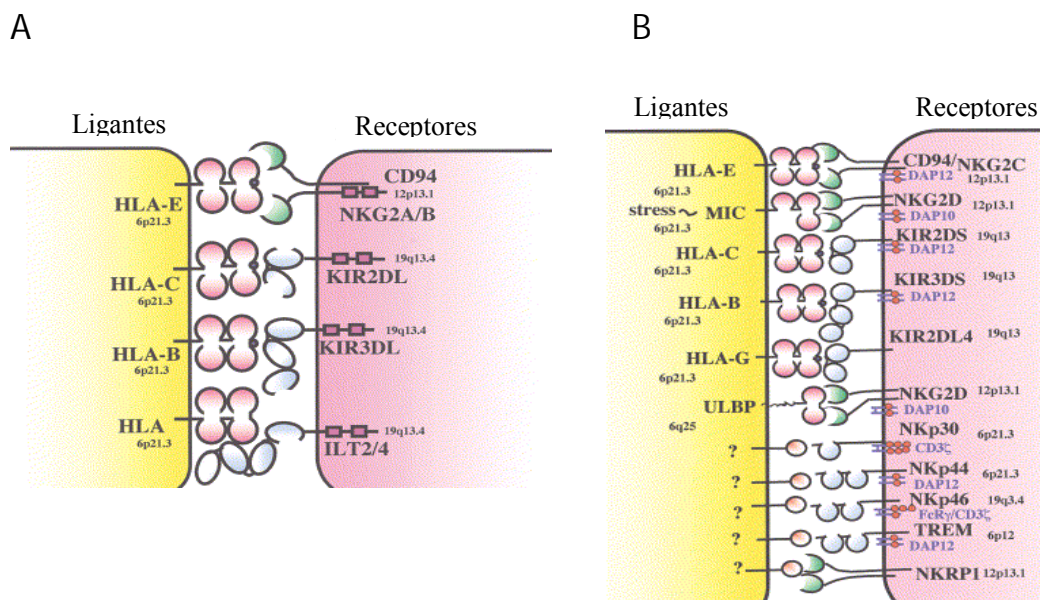


FIGURA 3 - INTERAÇÕES ENTRE RECEPTORES INIBIDORES E ATIVADORES COM MHC CLASSE I.

A – MOLÉCULAS SEMELHANTES À IMUNOGLOBULINA DE 2 E 3 DOMÍNIOS CITOPLASMÁTICOS, COM POTENCIAL INIBIDOR, SÃO MOSTRADAS EM AZUL. ITIMS SÃO MOSTRADOS COMO CAIXAS RETANGULARES. B - RECEPTORES NK ATIVADORES, COM SEUS ITAMS REPRESENTADOS COMO PEQUENOS DISCOS VERMELHOS. *KIR2DL4* APRESENTA POTENCIAIS INIBIDOR E ATIVADOR (TROWSDALE, 2001).

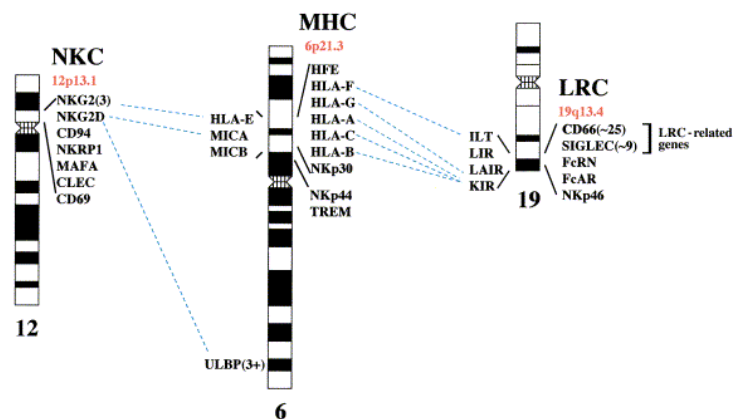


FIGURA 4 - INTERAÇÃO DOS GENES DO NKC E LRC COM O MHC E MOLÉCULAS RELACIONADAS.

AS LINHAS PONTILHADAS REPRESENTAM INTERAÇÕES LIGANTE/RECEPTOR CONHECIDAS (TROWSDALE, 2001).

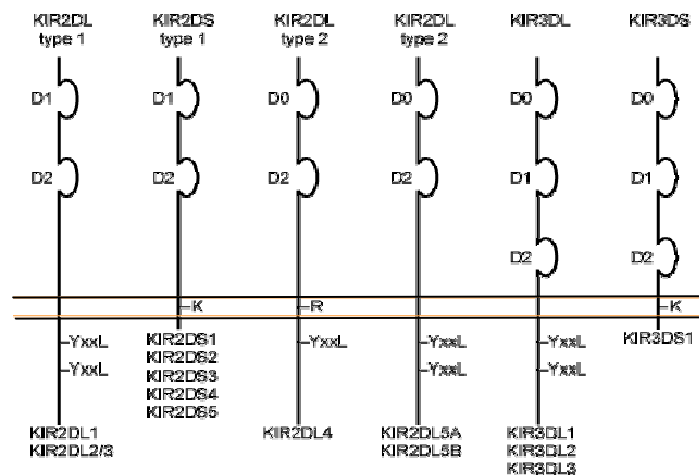


FIGURA 5 - ESTRUTURA E NOMENCLATURA DE MOLÉCULAS KIR.

A LINHA HORIZONTAL REPRESENTA A MEMBRANA CELULAR. OS DOMÍNIOS EXTRACELULARES ESTÃO REPRESENTADOS ACIMA DA MEMBRANA E A CAUDA CITOPLASMÁTICA, ABAIXO. CAUDAS LONGAS (L) E CURTAS (S) E O NÚMERO DE DOMÍNIOS DEFINEM O NOME DO GENE. OS DOIS PSEUDOGENES SÃO CHAMADOS *KIR2DP1* E *KIR3DP1*. O PRIMEIRO APRESENTA SEMELHANÇA COM OUTROS GENES DE DOIS DOMÍNIOS ENQUANTO O SEGUNDO APRESENTA SEMELHANÇA COM O *KIR3DL3*. ELES PODEM APRESENTAR DIVERSOS NOMES NA LITERATURA, COMO *KIRZ* E *KIRX* RESPECTIVAMENTE (CARRINGTON E NORMAN, 2003).

2.6 DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA

Em humanos, foram identificados quinze genes *KIR* e dois pseudogenes (WILSON et al., 2000). No entanto, o diferente e incomum polimorfismo desse complexo faz com que os genes *KIR* existentes sejam contados de maneira diferente por diversos autores. Eles estão situados em um segmento de DNA que foi submetido à expansão e contração ao longo da evolução e estudos sobre haplótipos *KIR* sugerem uma história de duplicação gênica e permuta desigual na região (CARRINGTON e NORMAN, 2003). Os haplótipos dos genes *KIR* foram separados em dois haplogrupos, A e B (FIGURA 6). O haplogrupo A é composto basicamente por um único haplótipo no que se refere a conteúdo gênico, ou seja, presença/ausência de determinados genes. É constituído sempre por sete genes, contrariamente ao haplogrupo B, que contém vários haplótipos quanto ao conteúdo gênico, com sete a onze genes. No entanto, o haplótipo A é o mais comum na maioria das populações já estudadas (UHRBERG et al., 1997; UHRBERG, PARHAM e WERNET, 2002).

A diferença mais relevante entre esses dois haplogrupos, que traz uma implicação funcional, é o número de genes que codificam receptores estimuladores (ou ativadores). O haplótipo A contém um único gene *KIR* ativador, *2DS4*, além do *2DL4* que é tanto inibidor quanto ativador. Já o haplogrupo B contém uma variedade de combinações de *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5*, *3DS1*, *2DS4*, além de *2DL4*. Entretanto, o gene ativador do haplogrupo A, *2DS4*, possui um alelo nulo freqüente em 80% da população irlandesa (MAXWELL et al., 2002). Do mesmo modo, *2DL4* possui um grande número de alelos não funcionais causados por deleções que alteram a matriz de leitura (YAWATA et al., 2006).

Os haplótipos dos genes *KIR* diferenciam-se pela quantidade e variedade de genes que os compõem. Com o polimorfismo alélico desses genes, haplótipos idênticos quanto ao conteúdo gênico podem diferir pela combinação alélica. Dessa forma, há três componentes que determinam a diversidade dos genótipos *KIR*: os genes presentes nos diferentes haplótipos, polimorfismo alélico e a combinação de haplótipos materno e paterno. Esses três componentes combinados aliados à elevada heterozigosidade em populações fazem com que seja praticamente impossível achar duas pessoas não relacionadas geneticamente que apresentem os mesmos variantes dos genes *KIR*. Os haplótipos mais freqüentes em estudos realizados estão listados na FIGURA 7.

Muito do que se sabe a respeito dos haplótipos se deve a estudos realizados sobre perfis de genótipos *KIR*, ou seja, pela presença ou ausência de genes em indivíduos não aparentados. Alguns pares de genes do haplogrupo B apresentam um desequilíbrio de ligação muito forte, o que pode possibilitar a identificação dos haplótipos (UHRBERG et al., 1997). Já foram descritos mais de 100 perfis quanto à presença/ausência dos genes *KIR* (CARRINGTON e NORMAN, 2003) e o número continua aumentando à medida que mais estudos populacionais são realizados.

Expansão e contração da região *KIR* parecem ter ocorrido devido, principalmente, à permuta desigual. Como consequência desse evento genético, é possível a ocorrência de haplótipos que possuem duas ou mais cópias de um gene e um rearranjo na ordem dos locos. *KIR2DL5* é o gene identificado mais recentemente (VILCHES et al., 2000) e novas análises de segregação mostraram que alelos desse único gene ocupam dois locos (*2DL5A* e *2DL5B*) que podem estar concomitantemente no mesmo haplótipo (GOMEZ-LOZANO et al., 2002). Haplótipos contendo múltiplas cópias de um mesmo gene aumentam ainda mais a diversidade haplotípica de *KIR*.

As frequências dos haplótipos dos grupos A e B variam muito de uma população para outra. Já foram registradas frequências haplotípicas do haplótipo A de 75% em japoneses, 58% em caucasóides, mas de apenas 15% em aborígenes australianos (TONEVA et al., 2001; YAWATA et al., 2002; PARHAM, 2005). A maior diversidade haplotípica intra-populacional foi registrada em populações sul-asiáticas (NORMAN et al., 2002; RAJALINGAM et al., 2002) e a menor em japoneses (YAWATA et al., 2002). Compreender a diversidade haplotípica entre populações é importante para elucidar variações de susceptibilidade e resistência a doenças complexas e planejamento desse tipo de estudo, além de ajudar a reconstruir a história biológica de populações humanas.

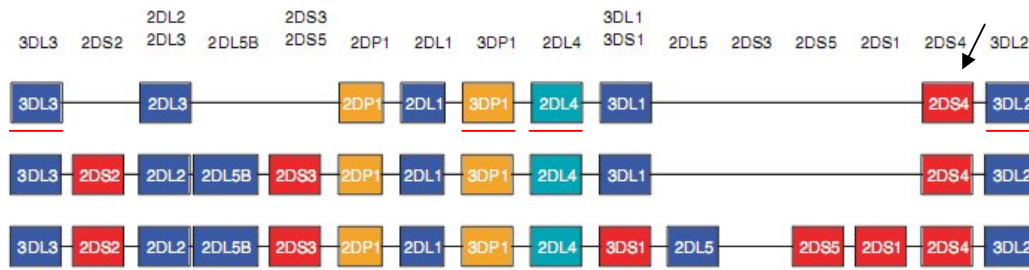


FIGURA 6 - ORDEM DE GENES DE DOIS HAPLÓTIPOS DE GENES KIR COMPLETOS.

TRÊS EXEMPLOS DE HAPLÓTIPOS, EM QUE O PRIMEIRO É O REPRESENTANTE MAIS COMUM DO HAPLOGRUPO A E OS OUTROS DOIS SÃO EXEMPLOS DE REPRESENTANTES DO HAPLOGRUPO B. OS GENES MARCADOS (GRIFADOS) SÃO PRESENTES EM TODOS OS HAPLÓTIPOS. A SETA INDICA O ÚNICO GENE ESTIMULADOR DE CAUDA CURTA DO HAPLÓTIPO A. O HAPLOGRUPO B ESTÁ REPRESENTADO POR DOIS ÚNICOS HAPLÓTIPOS, DOS MUITOS JÁ DESCRITOS. FIGURA ADAPTADA DE CARRINGTON E NORMAN (2003).

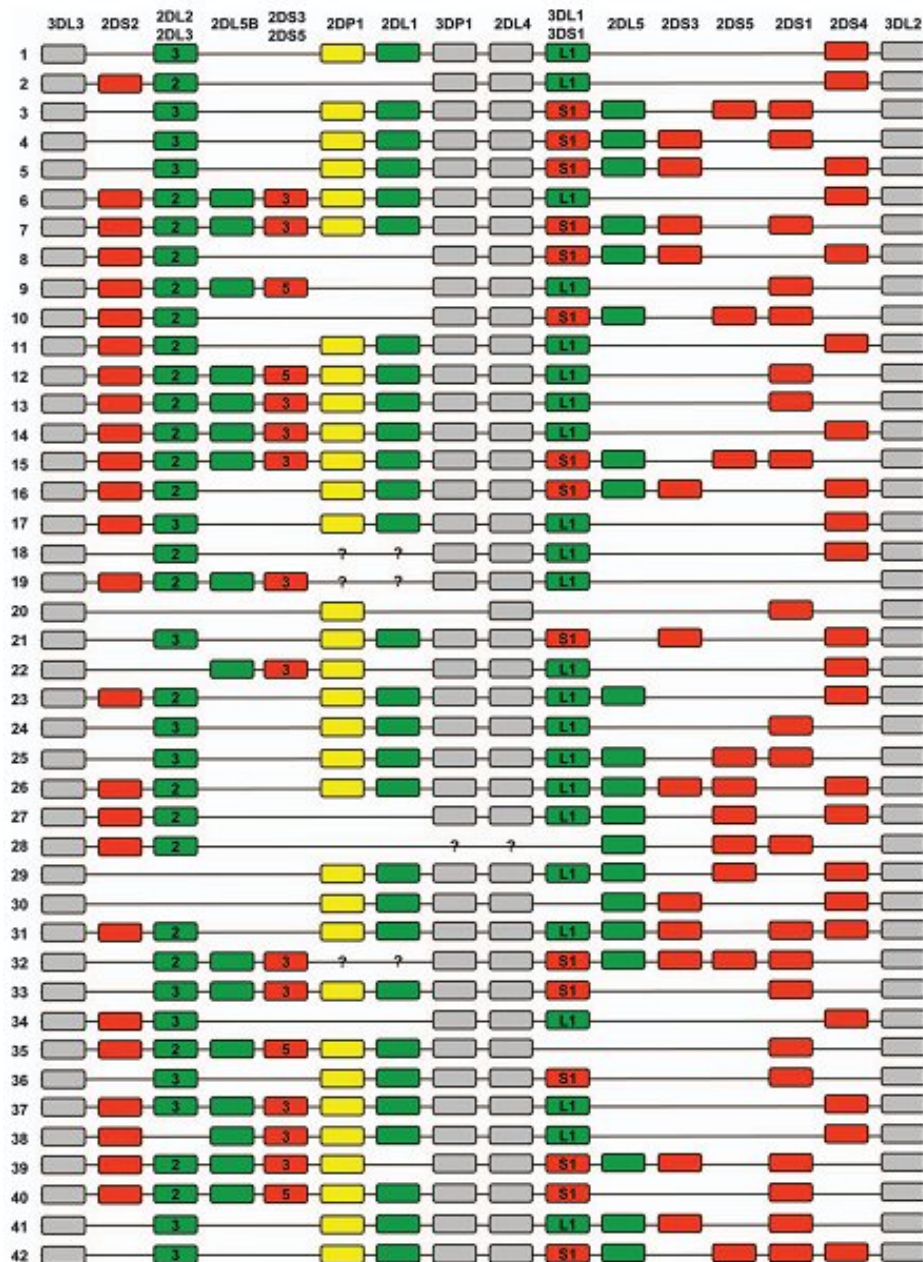


FIGURA 7 - DIVERSOS HAPLÓTIPOS DOS GENES KIR, COM BASE NO CONTEÚDO GÊNICO.

OS HAPLÓTIPOS FORAM DETERMINADOS POR ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO, MAS MUITOS AINDA PODEM SOFRER ALTERAÇÕES JÁ QUE NEM SEMPRE A ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO PODE DETERMINAR PRECISAMENTE O CONTEÚDO GÊNICO. PORTANTO, ALGUNS HAPLÓTIPOS FORAM DEFINIDOS PELA FREQUÊNCIA GÊNICA E POR DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE PARES DE GENES KIR. (KHAKOO E CARRINGTON, 2006).

2.7 DIVERSIDADE ALÉLICA

O polialelismo nos locos dos haplótipos *KIR* é mais um fator que contribui para a diversidade *KIR*, mesmo para aqueles indivíduos que possuem haplótipos que não diferem quanto ao conteúdo gênico. Devido à similaridade entre os genes dos receptores da superfamília das imunoglobulinas e a história de permuta desigual, foi sugerido que diferentes genes podem ter ocupado o mesmo loco. Havia sido sugerido que os genes *2DS4* e *2DS1* segregavam como alelos de um mesmo loco (UHRBERG et al., 1997), no entanto, dados mais recentes revelam que eles estão em diferentes locos. Os genes *3DL1* e *3DS1* parecem ocupar a mesma região genômica em diferentes haplótipos (WILSON et al., 2000) e estudos de segregação indicam que eles são alelos de um mesmo loco (GARDINER et al., 2001). Entretanto, já foram descritos haplótipos raros em que ocorre a ausência ou presença de ambos (CRUM et al., 2000; GARDINER et al., 2001), que podem ter sido formados por permuta desigual subsequentes à formação do gene. Já foi sugerido por diversos estudos que os genes *2DL2* e *2DL3* também se comportam como alelos de um mesmo loco (WITT et al., 1999; CRUM et al., 2000; NORMAN et al., 2002).

Através de seqüenciamento, um novo variante para o gene *2DS4*, caracterizado por uma deleção de 22pb, foi descrito (HSU et al., 2002). Essa deleção ocorre na região que codifica o segundo domínio semelhante à imunoglobulina da região extracelular e, com isso, há mudança no quadro de leitura, de forma que esse variante resulta em uma proteína sem função. Devido à homologia do novo variante com o gene do receptor de NK presente em macacos *Mm-KIR1D*, foi a ele sugerido o nome de *KIR1D* também em humanos. *KIR1D* apresenta frequência elevada em vários estudos populacionais já realizados (DENIS et al., 2005; JIANG et al., 2005; GUTIERREZ-RODRIGUEZ et al., 2006; MAHFOUZ et al., 2006) e também foi analisado no presente trabalho. No entanto, sabe-se hoje que *1D* consiste de um grupo de pelos menos cinco alelos (ROBINSON et al., 2003).

2.8 IMUNOGENÉTICA DOS RECEPTORES DAS CÉLULAS NK

A baixa expressão de moléculas MHC elimina o sinal inibidor, causando a morte da célula infectada ou transformada. Esse modelo é conhecido como “*missing-self*” (falta do próprio), pois as células exterminadoras naturais agem quando reconhecem a

ausência de moléculas que conferem a identidade da célula diferentemente dos linfócitos T que geralmente agem pelo reconhecimento de moléculas alteradas (do inglês *altered-self*). Conseqüentemente, todas as células NK possuem pelo menos um receptor inibidor para o reconhecimento das células do próprio organismo (LJUNGGREN et al., 1991; VALIANTE e PARHAM, 1997).

Uma alorreção ocorre quando as moléculas HLA das células alogênicas não incluem os ligantes inibidores das células NK. Esse fenômeno pode ser ilustrado com receptores KIR específicos para HLA-C. Moléculas HLA-C possuem um polimorfismo na posição 80 da sequência de aminoácidos, que determina dois grupos distintos de ligantes inibidores. Ligantes HLA-C com lisina na posição 80 se ligam ao *2DL1* enquanto as moléculas HLA-C com uma asparagina na posição 80 se ligam em *2DL2* e *2DL3*. Uma pessoa que possui os dois tipos distintos de HLA-C apresenta um conjunto de células NK que é inibido pelas moléculas HLA-C com lisina e outro conjunto de células que é inibido por HLA-C com asparagina na posição 80. Nesse caso, suas células NK causarão lise das células de quaisquer pessoas que sejam homozigotas para asparagina 80 ou lisina 80, já que as células do homozigoto para lisina 80 serão lisadas pelo conjunto de células que não terão seu receptor *2DL1* inibido e as células de homozigotos para asparagina 80 serão eliminadas pelas NK que não terão seus receptores *2DL2* e *2DL3* inibidos (KARRE, 2002). Esse tipo de reação pode ajudar aos pacientes de leucemia que recebem transplantes de medula óssea, uma vez que as células neoplásicas, caso sobrevivam à intensa radioterapia e quimioterapia, serão eliminadas pelas células NK transplantadas. Dessa forma há uma diminuição drástica na chance de reincidência da doença (PARHAM e MCQUEEN, 2003).

Os receptores ativadores já foram associados a muitas doenças. Estudos mostram que os genes *2DS1* e *2DS2* conferem susceptibilidade à artrite psoriática caso haja ausência de ligantes HLA-C para os receptores inibidores *2DL1* e/ou *2DL2/3* (MARTIN et al., 2002). A presença do gene *2DS1*, em conjunto com a ausência dos ligantes dos genes *2DL2* e *2DL3*, está associada a uma pior recuperação de pacientes de leucemia mielóide tratados com transplante de medula óssea (COOK et al., 2004). A diabetes tipo 1 foi associada ao aumento de genes *KIR* ativadores em conjunto com a combinação de *2DS2* e a presença de HLA-C com asparagina 80 (VAN DER SLIK et al., 2003). De forma parecida, a combinação entre *2DS2* e HLA-C asparagina 80 estão associados à vasculite, ocorrendo como complicação da artrite reumatóide (YEN et al., 2001). No entanto, é importante lembrar que essas associações de doenças com genes ativadores

podem ser decorrentes de desequilíbrio de ligação com outros locos. Dessa forma, ainda permanecem desconhecidos os motivos que levam células NK, responsáveis principalmente pela defesa inata do organismo, a estarem associadas a doenças autoimunes.

2.9 ASPECTOS EVOLUTIVOS

Em estudos recentes sobre *KIR* foi sugerido que a variação do conteúdo gênico e a diversidade alélica podem afetar a função e o nível de especificidade e sensibilidade das células NK. A presença ou ausência de alguns genes pode ser diretamente associada ao ganho ou perda de especificidade como, por exemplo, o já citado *2DL1* e seu ligante específico HLA-C com lisina na posição 80. A variação no número de genes também é associada a mudanças qualitativas na ação específica das NK. Desse modo, a seleção natural, pode alterar as frequências de certos genes, dependendo de fatores ambientais e endógenos, garantindo maior resistência a certos tipos de infecções e outras doenças. Além disso, diferenças populacionais podem ser decorrentes da ação da deriva genética, efeito fundador e fluxo gênico.

Genes *KIR* podem ser usados como marcadores. Estudos sobre a diversidade desse complexo podem ajudar a reconstruir a história biológica da espécie humana e a entender porque certas variantes dos genes *KIR* podem estar sob efeito de seleção natural. Populações com histórias biológicas diferentes podem mostrar diferença nas frequências dos genes *KIR* devido às diferenças de fatores endógenos e exógenos aos quais estão submetidos.

2.10 O PAPEL DAS CÉLULAS NK NA AUTOIMUNIDADE

Desde 1980, vários estudos já descreveram uma diminuição acentuada do número e da atividade das células NK no sangue periférico em pacientes com doenças autoimunes, como artrite reumatóide, diabetes melitus, lúpus eritematoso sistêmico, entre outras. O papel das NK na autoimunidade, revisado por vários autores (FLODSTROM et al., 2002; FRENCH e YOKOYAMA, 2004), será brevemente descrito a seguir.

Já foi visto que as NK atacam células alvo através de citocinas e citotoxicidade direta. As quimiocinas e citocinas liberadas por essas células influenciam o início da resposta imune adaptativa. Dessa forma, as funções das NK devem ser reguladas cuidadosamente para que não haja danos em tecido saudável ou liberação alterada dessas substâncias que poderiam desregular a atividade do sistema imune adaptativo.

Foi sugerido que as células NK, inicialmente reconhecidas componentes da imunidade inata, também atuam na imunidade adaptativa. Linfócitos T autorreativos podem ser ativados quando autoantígenos ou moléculas semelhantes a eles são transportados para os órgãos linfóides e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos. Portanto, uma etapa crítica de regulação acontece nesse local. Salazar-Mather, Biron e colaboradores (SALAZAR-MATHER, ISHIKAWA e BIRON, 1996; BIRON et al., 1999) sugeriram que as células NK migram para a região rica em células apresentadoras de antígenos e podem regular as respostas imunes em infecções virais. Outros estudos corroboram essa hipótese, mostrando que as células NK são recrutadas no local de apresentação de antígenos influenciando de maneira crítica e/ou regulando o início da resposta imune adaptativa.

A comunicação entre células NK e as células dendríticas não é unidirecional. A maturação das células dendríticas mediada por NK é o elo entre a resposta por NK e a resposta por células T. O contato com o receptor NKp30 das células NK influencia a maturação das células dendríticas, que também podem acentuar as atividades citolíticas e a produção de interferon pelas células NK.

As células dendríticas atuam apresentando antígenos para os linfócitos T. Além da ativação de células T, as células dendríticas regulam a proliferação e diferenciação de linfócitos B e a secreção de imunoglobulinas, a aquisição de suas funções efetoras e recrutamento para os tecidos, o que pode trazer consequências para o desenvolvimento de resposta contra antígenos próprios. Esse conjunto de interações torna as NK importantes na atividade dos linfócitos B.

Foi descrita a participação das células NK no desenvolvimento da doença autoimune miastenia grave em ratos (SHI et al., 2000), a qual é mediada por células B e anticorpos. Além disso, foi evidenciada uma relação forte as células NK e células T e B autorreativas.

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Estudos populacionais fornecem dados de frequência que permitem um melhor conhecimento da evolução do polimorfismo genético e das relações biológicas entre as populações humanas. Além disso, é possível observar as variações de frequências alélicas em cada população individual e comparar populações entre si. Também é possível investigar a diversidade alélica intra e inter-populacional, as distâncias genéticas entre populações, os perfis genéticos distintos, os alelos ancestrais, mecanismos de manutenção e geração de tais polimorfismos e a influência de fatores genéticos na susceptibilidade a certas doenças. Verificar essas variações permite, portanto, caracterizar as populações quanto às suas relações históricas e genéticas, assim como, compreender melhor o significado dos polimorfismos genéticos.

Os genes *KIR* são importantes para as respostas imunes, porém ainda são pouco compreendidos. Poucas populações humanas foram caracterizadas em relação a esses genes e para populações brasileiras há apenas duas populações descritas a respeito das frequências de genes *KIR*. Em vista disso, no presente estudo temos como objetivo caracterizar uma população brasileira de origem predominantemente européia em relação à diversidade *KIR* no contexto de seus ligantes HLA conhecidos e comparar com outras populações já descritas.

Os objetivos específicos são:

- Estimar a frequência de presença de cada gene e calcular as frequências gênicas;
- Calcular a frequência de haplótipos A e B;
- Verificar a frequência do grupo alélico não funcional do gene *2DS4*;
- Identificar os perfis gênicos de todos os indivíduos da amostra;
- Inferir os haplótipos presentes na amostra populacional;
- Estimar a distância genética entre a população desse estudo e outras 59 populações caracterizadas anteriormente;
- Identificar os ligantes HLA presentes na amostra e verificar se as combinações ligante-receptor estão distribuídas aleatoriamente;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo (N = 153) trata-se de uma população saudável, miscigenada, com ancestralidade predominantemente européia residente em Curitiba e região metropolitana. Curitiba é a capital do Estado do Paraná e foi fundada oficialmente em 29 de março de 1693. Até o século 18, os habitantes da cidade eram índios, mamelucos, portugueses e espanhóis. Com a emancipação política do Paraná (1854) e o incentivo governamental à colonização na segunda metade do século 19, Curitiba foi transformada pela intensa imigração de europeus. Alemães, franceses, suíços, austríacos, poloneses, italianos e ucranianos foram os principais imigrantes que contribuíram com o crescimento populacional. Curitiba conta hoje com uma população de 1.797.408 habitantes e mesmo tendo recebido imigrantes de todas as localidades brasileiras, principalmente paulistas, gaúchos, mineiros e nordestinos, a capital paranaense ainda é uma cidade de origem predominantemente européia (Fonte: Prefeitura Municipal de Curitiba: <http://www.curitiba.pr.gov.br> acesso 09/08/08 às 17h30 e IBGE: www.ibge.com.br acesso 09/08/08 às 17h45)

Todos os indivíduos da amostra não possuem vínculos genéticos entre si e participaram voluntariamente do estudo, lendo e assinando um termo de consentimento. Foi estabelecido um critério para classificar os participantes, de acordo com características morfológicas, cor e tipo de cabelo, cor de pele como uma maneira de estimar a contribuição relativa de ancestrais europeus, orientais, indígenas e africanos de cada indivíduo. Essa metodologia utilizada para subdividir a amostra populacional em estratos, de acordo com a ancestralidade e o grau de miscigenação foi previamente validado por estudos de genética de populações do nosso grupo de pesquisa, que mostraram que a distribuição de alelos que são sabidamente restritos a populações autóctones de um continente segue um gradiente através dos estratos populacionais, compatível com a ancestralidade inferida pela classificação baseada em características morfológicas (BRAUN-PRADO et al., 2000; PROBST et al., 2000).

4.2 COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA

A coleta de 20ml de sangue periférico foi realizada no Laboratório de Genética Molecular Humana, no Departamento de Genética da UFPR ao longo dos anos, desde 1994 até os dias atuais, por vários membros da equipe. A extração de DNA foi através do método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, seguido de precipitação de DNA com álcool isopropílico (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATS, 1989). O DNA foi, posteriormente, lavado em etanol 70% e dissolvido em tampão TE (tris-EDTA) 1000:1.

4.3 GENOTIPAGEM

A genotipagem de catorze genes *KIR* e um pseudogene foi realizada pelo método de PCR (*polymerase chain reaction*) baseado em oligonucleotídeos de sequência específica, PCR-SSP (*specific sequence primer*), cujo protocolo segue na TABELA 2. Na parte final do processo de genotipagem, foi incorporado o uso de um controle interno de PCR, que amplifica o gene *HLA-DRB1*. Quando utilizado, foi introduzido no protocolo uma quantidade de 0,1ul de solução de cada oligonucleotídeo a 20mM. As sequências de todos os oligonucleotídeos estão listadas na TABELA 3.

As condições de amplificação foram: desnaturação a 94°C por 180s; Após, 04 ciclos de 94°C por 15s, 65°C por 15s e 72°C por 30s e, 21 ciclos de 94°C por 15s, 60°C por 15s e 72°C por 30s; seguidos de 5 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 15s e 72°C por 30s; finalmente, 72°C por 720s.

Após amplificação, foi realizada corrida eletroforética por 50 minutos a 70 Volts em gel de agarose 3% (Invitrogen) e coloração com brometo de etídeo para visualizar a presença ou ausência dos amplicons correspondentes a cada gene *KIR* e também correspondente ao grupo alélico não funcional de *2DS4*. Todos os genes foram genotipados com dois pares de oligonucleotídeos iniciadores com hibridação em locais distintos, com o objetivo de maior controle e confiabilidade dos resultados, com exceção de *2DS1* e *2DS5*. Para esses dois genes, há impossibilidade de projetar outro par de oligonucleotídeos iniciadores específicos em função da alta similaridade de sequência com outros genes *KIR*. Quando não houve concordância entre os diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores, o procedimento de genotipagem foi repetido com ambos os pares de oligonucleotídeos. A genotipagem dos genes HLA -A, -B e -C foi realizada previamente pelo método de PCR baseado em oligonucleotídeos-sonda de sequência específica, PCR-SSOP (BRAUN-PRADO et al., 2000).

TABELA 2 – PROTOCOLO DA PCR-SSP

Reagentes	Volume/Quantidade
Tampão PCR 10x	1ul
MgCl ₂ 50mM	0,3ul
dNTP (25mM)	0,08ul
Primers 3'e 5' 20mM	0,2ul de cada
<i>Taq Polymerase Platinum (Invitrogen)</i>	0,05ul
DNA	~10ng
Água	7,67ul
Volume final	10ul

4.4 ANÁLISE DE PERFIS

A nomenclatura dos perfis *KIR* não é consensual e uma nomenclatura padronizada ainda não foi estabelecida. O banco de dados “Allele frequencies.net” (MIDDLETON et al., 2003) foi usado como referência para identificar os perfis e obter resultados para comparações entre populações. Perfis únicos foram cuidadosamente analisados e retipados duas a três vezes para validar os resultados.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a leitura dos géis, os dados foram transferidos a um banco de dados do Microsoft Access, versão 97 e processados no programa Convert (PROBST, 1998). As frequências de presença de cada gene (*F*) foram calculadas por contagem direta. Devido ao fato de que a ausência de um gene *KIR* ser recessiva, no procedimento de genotipagem os heterozigotos e os homozigotos para presença do gene apresentam o mesmo resultado. Para calcular a frequência do gene foi utilizada a fórmula de Bernstein: frequência alélica = $1 - \sqrt{1 - f}$, sendo *f* a frequência de presença do gene observada na população. Essa fórmula assume que as frequências do estudo seguem as proporções de Hardy-Weinberg. As frequências dos “genes alélicos” *2DL2-2DL3* e *3DL1-3DS1* foram estimadas através de duas abordagens: (1) considerando que são genes independentes, como os demais genes e (2) considerando que segregam como alelos do mesmo loco, possuindo três alelos dos quais dois são co-dominantes (os “genes”) e um é recessivo (a ausência do gene).

As frequências dos haplogrupos A e B foram estimadas por contagem direta a partir da lista de perfis e comparadas com as estimadas, considerando o equilíbrio de Hardy-Weinberg, em que A é recessivo. Nessa estimativa, a frequência dos indivíduos homozigotos para o haplogrupo A corresponde a q^2 . Portanto, a frequência do haplogrupo A (*q*) foi calculada a partir da raiz quadrada da frequência de homozigotos A e a frequência dos haplótipos B, através da fórmula: $p = 1 - q$.

O grupo não funcional do gene *2DS4*, muito frequente em populações já analisadas, resultante de uma deleção na região que codifica o domínio extracelular, foi analisado. Para os indivíduos portadores desse variante, é possível visualizar uma banda mais rápida na corrida eletroforética (22pb menor). Portanto, houve a possibilidade de separar os indivíduos que apresentam apenas a banda rápida ou apenas a banda lenta, os que são heterozigotos (bandas rápida e lenta) e os que não apresentam o gene.

TABELA 3 – LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (UHRBERG et al., 1997)

Gene	Primers	Seqüências	Exon	Posição	Tamanho (pb)
2DL1	KIR1.5/1.3A	GTT GGT CAG ATG TCA TGT TTG AA	4	472-494	146
		GGT CCC TGC CAG GTC TTG CG	4	598-617	
	KIR2.5/2.3A	TGG ACC AAG AGT CTG CAG GA	8	1159-1178	~330
		TGT TGT CTC CCT AGA AGA CG	9	1403-1422	
2DL2	KIR3.5/3.3	CTG GCC CAC CCA GGT CG	4	419-435	173
		GGA CCG ATG GAG AAG TTG GCT	4	571-591	
	KIRex5.5/5.3	GAG GGG GAG GCC CAT GAA T	5	813-831	150
		TCG AGT TTG ACC ACT CGT AT	5	944-963	
2DL3	KIR5.5/5.3	CTT CAT CGC TGG TGC TG	7	1118-1134	~550
		CGG CTC TTG GTC CAT TAC AA	8	1153-1172	
	KIR6.5/6.3	TCC TTC ATC GCT GGT GCT G	7	1116-1134	~800
		GGC AGG AGA CAA ATT TGG ATC A	9	1350-1371	
2DL4	KIR7.5/7.3	CAG GAC AAG CCC TTC TGC	3	116-133	254
		CTG GGT GCC GAC CAC T	3	354-369	
	KIR8.5/8.3	ACC TTC GCT TAC AGC CCG	5	709-727	288
		GGG TTT CCT GTG ACA GAA ACA G	5	975-996	
2DS2	KIR11.5/11.3	TTC TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	4	501-522	173
		AGG TCA CTG GGA GCT GAC AA	4	656-675	
	KIR12.5/12.3	CGG GCC CCA CGG TTT	5	729-743	240
		GGT CAC TCG AGT TTG ACC ACT CA	5	946-968	
2DS3	KIR13.5/13.3	TGG CCC ACC CAG GTC G	4	420-435	242
		TGA AAA CTG ATA GGG GGA GTG AGG	4	638-661	
	KIR14.4/14.3	CTA TGA CAT GTA CCA TCT ATC CCA	5	787-810	190
		AAG CAG TGG GTC ACT TGA C	5	958-976	
2DS4	9Fa/12Ra	CTG GCC CTC CCA GGT CA	4	416-435	204
		TCT GTA GGT TCC TGC AAG GAC AG	4	600-622	
	del.5B	GTT CAG GCA GGA GAG AAT			197/219
	del.3	GTT TGA CCA CTC GTA GGG AGC			
2DS5	13F/9R	TGA TGG GGT CTC CAA GGG	4	557-574	125
		TCC AGA GGG TCA CTG GGC	4	665-682	
2DS1	F1/F2/R3	<u>CTT CTC CAT CAG TCG CAT GAA</u>	4	578-598	102
		CTT CTC CAT CAG TCG CAT GAG	4	578-598	
		AGA GGG TCA GTG GGA GCT GAC	4	659-679	
3DL1	7Fa/3Ra	CGC TGT GGT GCC TCG A	3	144-163	197
		GGT GTG AAC CCC GAC ATG	3	321-340	
	3DS1.5a13Ra	CCC TGG TAG AAT CAG GAG AGA G	4	435-456	181
		TGT AGG TCC CTG CAA GGG CAA	4	600-620	
3DL2	KIR19.5/19.3	CAA ACC CTT CCT GTC TGC CC	3	121-140	245
		GTG CCG AAA ACC CAG TGA	3	348-365	
	KIR20.5/20.3	CCC ATG AAC GTA GGC TCC G	5	822-840	130

Continua

		CAC ACG CAG GGC AGG G	5	936-951	
3DS1	Ex9.1/9.3	AGC CTG CAG GGA ACA GAA G	8	1169-1189	~300
		GCC TGA CTG TGG TGC TCG	9	1377-1394	
	KIR22.5/22.3	CCT GGT GAA ATC AGG AGA GAG	4	436-456	177
		GTC CCT GCA AGG GAC C	4	600-615	
3DL3	KIR35.5/35.3	GTC AGA TGT CAG GTT TGA GCG	4	467-487	112
		CTA GGA ATA GTT GAC CTG GGA AC	4	556-578	
	KIR36.5/36.3	GCA GCT CCC GGA GCT TG	5	763-779	190
		GGG TCT GAC CCA GCG TG	5	936-952	
2DL5	KIR29.5/29.3	GCG CTG TGG TGC CTC G	3	148-163	214
		AGC CAC TCA ATG GGG GAG C	3	343-361	
	KIR30.5/30.3	TGC AGC TCC AGC AGC TCA	5	771-788	194
		GGG TCT GAC CAC TCA TAG GGT	5	941-961	
2DP1	KIR33.5/33.3	GTC TGC CTG GCC CAG CT	3	134-150	205
		GTG TGA ACC CCG ACA TCT GTA C	3	317-338	
	KIR49.5/49.3	CCA TCG GTC CCA TGA TGG	4	583-600	90
		CAC TGG GAG CTG ACA ACT GAT G	4	651-672	
CONTR OLE	IC 5'/IC 3'	TGC CAA GTG GAG CAC CCA A			796
		GCA TCT TGC TCT GTG GAG AT			

Como não é possível diferenciar aqueles indivíduos que são heterozigotos para alelo/ausência (já que a ausência é recessiva), as frequências alélicas foram estimadas supondo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças entre populações foram comparadas a partir do teste exato de diferenciação populacional e o desequilíbrio de ligação (MATTIUZ et al., 1971). Após estimativa de frequências haplotípicas, foi utilizado o pacote de programas computacionais Arlequin, versão 3.16 (EXCOFFIER, LAVAL e SCHNEIDER, 2005) para a obtenção dos valores de D' e r^2 .

As distâncias genéticas foram estimadas a partir do método de Nei (NEI, 1972) e o dendrograma foi produzido pelo método neighbor-joining (SAITOU e NEI, 1987) utilizando o pacote de programas de inferência filogenética PHYLIP (FELSENSTEIN, 1989) e visualizado no programa Treeview (PAGE, 2002). O programa Haplo-IHP (YOO et al., 2007) foi utilizado para auxiliar na inferência de haplótipos, que após, foram manualmente e individualmente verificados, a partir do conhecimento prévio da diversidade *KIR*.

Populações de diversas regiões geográficas e de diferentes ancestralidades que já tiveram a diversidade *KIR* descrita foram comparadas nesse estudo. Um total de 59 populações foi utilizado para a construção do dendrograma. Embora haja mais populações descritas, nem todas apresentam resultados para todos os genes *KIR*, por isso, foram excluídas. Também excluímos da análise os genes de moldura que, por estarem presente em praticamente 100% dos indivíduos de todas as populações, não são informativos.

5 RESULTADOS

5.1 FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR*

Todas as frequências dos genes *KIR* encontradas na amostra populacional de Curitiba estão mostradas na TABELA 4. Observamos que as frequências dos genes *KIR* inibidores foram mais elevadas e homogêneas que as frequências dos genes ativadores. Exceto *2DL5* (51,9%), todos os genes *KIR* inibidores foram encontrados com frequência de presença de pelo menos 59% (*2DL2*) até 100% (*3DL2* e *3DL3*), similar às de outras populações de ascendência européia. Com exceção do gene *2DS4*, nenhum outro gene ativador de cauda curta (*2DS* ou *3DS*) atingiu frequência de presença superior a 60%. O gene *2DL4* que, diferentemente dos demais, possivelmente tem dupla função ativadora e inibidora e que parece ter expressão constitutiva (CHAN et al., 2005), foi encontrado em todos os indivíduos (100%). Os “genes alélicos” *2DL2-2DL3* e *3DL1-3DS1* tiveram suas frequências calculadas como as dos demais genes, separadamente, mas também assumindo que são alelos do mesmo loco. Sob essas duas abordagens, as frequências de *2DL3* e *3DS1* apresentaram-se diferentes (TABELA 4).

5.2 COMPARAÇÕES ENTRE POPULAÇÕES

A amostra de Curitiba apresentou vários genes cujas frequências diferiram de forma estatisticamente significantes em comparação com as das amostras populacionais africana e asiática. Além das três populações européias ou euro-descendentes cujas frequências são mostradas na TABELA 4, outras amostras populacionais de mesma ancestralidade foram utilizadas para comparações de frequências com a amostra de Curitiba: Itália, Espanha, USA e Irlanda do Norte (dados não mostrados) (BONTADINI et al., 2006; DU et al., 2007; MIDDLETON, MEENAGH e GOURRAUD, 2007; MIDDLETON et al., 2007). A amostra da França, mais diferente de Curitiba que as demais, apresentou dois locos com frequências que variaram com significância estatística ($p < 0,05$). Com exceção da amostra francesa, todas as outras populações foram semelhantes para as frequências dos locos *KIR* ($p > 0,05$) e quando houve diferença, esta foi apenas para *2DL3*. Esse gene foi o que apresentou frequências mais heterogêneas entre as amostras de ancestralidade européia ou euro-descendentes testadas (TABELA 5).

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR*

		Curitiba			Brasil	Argentina	França	Japão	África	
		PE			1	2	3	4	5	
n		153			90	102	108	132	50	
Gene KIR	F (%)	fG	fA	F (%)	F (%)	F (%)	F (%)	F (%)	F (%)	
2DL1	97.4	0.84	-	96.7	96.1	97.0	100.0	96.0		
2DL2	59.4	0.36	0.36	52.2	62.5	50.0	***	11.4	***	72.0
2DL3	84.6	0.61	0.55	94.4	*	86.5	91.0	***	100.0	***
2DL4	100.0	1.00	-	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
2DL5	51.9	0.31	-	58.9	55.7	47.0	35.6	**	82.0	***
2DP1	94.7	0.77	-	96.7	96.1	97.0	100.0	98.0		
2DS1	42.1	0.24	-	37.8	45.4	36.0	33.3	10.0	***	
2DS2	59.2	0.36	-	53.3	54.5	51.0	11.4	***	64.0	
2DS3	32.5	0.18	-	38.9	28.6	31.0	13.6	***	38.0	
2DS4	93.6	0.75	-	95.6	95.0	96.0	99.2	100.0		
2DS5	31.9	0.17	-	32.2	35.4	27.0	22.0	62.0	***	
3DL1	92.7	0.73	0.74	95.6	95.0	96.0	99.2	**	100.0	
3DS1	37.3	0.21	0.26	41.1	42.0	44.0	31.9	4.0	***	
3DL2	100.0	1.00	-	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		
3DL3	100.0	1.00	-	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		

F = FREQUÊNCIA DE PRESENÇA; FG = FREQUÊNCIA GÊNICA; FA = FREQUÊNCIA ALÉLICA: CONSIDERADA APENAS PARA OS GENES ALÉLICOS 2DL2-2DL3 E 3DL1-3DS1. ASTERISCOS (*) REPRESENTAM POPULAÇÕES QUE APRESENTARAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS SIGNIFICANTES PARA UM DETERMINADO GENE: * REPRESENTA $0,050 < P < 0,010$; ** REPRESENTA $0,001 < P < 0,010$ E *** REPRESENTA $P < 0,001$. (PE = PRESENTE ESTUDO; 1 E 5 = MIDDLETON, MEENAGH E GOURRAUD, 2007; 2 = FLORES ET AL., 2007; 3 = DENIS ET AL., 2005; 4 = YAWATA ET AL., 2006).

TABELA 5 – MAIOR HETEROGENEIDADE DE FREQUÊNCIAS DE 2DL3 ENTRE CURITIBA E OUTRAS POPULAÇÕES EUROPEIAS OU EURO-DESCENDENTES.

	2DL1	2DL2	2DL3	2DL5	3DL1
ARG	0,62	0,34	0,18	0,18	0,15
BRA	1,00	0,46	<u>0,00</u>	0,14	0,20
ITA	0,28	0,40	<u>0,10</u>	0,48	0,12
FRA	1,00	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	1,00	0,15
IRL	0,57	0,21	<u>0,00</u>	0,40	0,21
ESP	0,27	0,88	0,70	0,79	1,00
EUA	1,00	0,13	<u>0,07</u>	0,50	0,28

VALORES DE P EM DIFERENTES POPULAÇÕES, PARA COMPARAÇÕES FEITAS COM A AMOSTRA POPULACIONAL DE CURITIBA. ALÉM DE TRÊS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTES, HÁ DOIS VALORES DE P PRÓXIMOS DO LIMAR DE SIGNIFICÂNCIA (USA E ITA). VALORES DE P QUE REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICANTES OU VALORES PRÓXIMOS DO LIMAR DE SIGNIFICÂNCIA ($P \leq 0,10$) ESTÃO SUBLINHADOS. (ARG: ARGENTINA = FLORES ET AL., 2007; BRA: BRASIL BELO HORIZONTE = MIDDLETON ET AL., 2008; ITA: ITÁLIA = BONTADINI ET AL., 2006; FRA: FRANÇA = DENIS ET AL., 2005; IRL: IRLANDA DO NORTE = MIDDLETON, MEENAGH E GOURRAUD, 2007; ESP: ESPANHA = MIDDLETON ET AL., 2007; EUA: ESTADOS UNIDOS = DU ET AL., 2005).

Os genes também foram testados em conjuntos com o objetivo de comparar populações. Comparando o conjunto total de genes *KIR*, a amostra populacional do estudo foi semelhante a todas as populações de ancestralidade européia ou predominantemente européia previamente analisadas e diferente de populações ameríndias, africanas ou afro-descendentes e asiáticas. Entretanto, comparando apenas as frequências dos genes *KIR* inibidores, Curitiba foi semelhante aos ameríndios da Venezuela e Argentina (TABELA 6).

5.3 DELEÇÃO DE 22PB EM *2DS4*

HSU et al. (2002) descreveram um variante não funcional de *2DS4* que foi chamado de *KIRID*. Agora, sabemos que se trata de um grupo de pelo menos quatro alelos que compartilham a mesma deleção (ROBINSON et al., 2003), cuja frequência foi estimada para a amostra populacional de Curitiba, considerando que as proporções seguem o equilíbrio de Hardy-Weinberg (TABELA 7). Estimamos que 54% dos indivíduos apresentam em ao menos um cromossomo um alelo funcional, enquanto 75% apresentam em ao menos um cromossomo um alelo não funcional.

5.4 PERFIS KIR E FREQUÊNCIA DE HAPLOGRUPOS

Cada perfil representa o fenótipo encontrado em cada indivíduo. Um total de 27 perfis foi encontrado (TABELA 8), sendo que o mais frequente, resultado do genótipo homozigoto A/A, esteve presente em 28,8% dos indivíduos. Dez perfis foram encontrados em um único indivíduo ($F = 0,8\%$ cada). Através da lista de perfis, por contagem direta, estimamos que as frequências dos haplogrupos A e B, que foram 54% e 46%, respectivamente. As frequências dos genótipos A/A, A/B e B/B estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,94$).

TABELA 6 – COMPARAÇÕES ENTRE A AMOSTRA POPULACIONAL DE CURITIBA E OUTRAS POPULAÇÕES PARA TODO O CONJUNTO DE GENES KIR E PARA OS SUBCONJUNTOS DE GENES INIBIDORES E ATIVADORES.

Ref.	População	Todos	Ativadores	Inibidores
2	Argentina	NS	NS	NS
1	Brasil B.Horizonte	NS	NS	NS
5	Itália	NS	NS	NS
3	França	NS	NS	NS
6	Espanha	NS	NS	NS
7	EUA	NS	NS	NS
4	Japão	***	***	***
8	China Hong Kong	***	*	***
5	África do Sul	***	***	***
9	Cidade do México	NS	NS	NS
10	VEN Warao	***	**	NS
11	VEN Bari	***	***	*
12	VEN Huilliches	***	**	*
13	ARG Chiriguano	*	***	NS
14	ARG Wichis	***	***	NS

ASTERISCOS REPRESENTAM POPULAÇÕES QUE APRESENTARAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAMENTE SIGNIFICANTES PARA UM DETERMINADO GENE, SENDO QUE: * REPRESENTA $0,050 > P > 0,010$; ** REPRESENTA $0,001 < P < 0,010$ E *** REPRESENTA $P < 0,001$ E NS REPRESENTA NÃO SIGNIFICANTE. AS ÚLTIMAS CINCO POPULAÇÕES SÃO AMERÍNDIAS; ARG: ARGENTINA; VEN: VENEZUELA. NOTE QUE CURITIBA DIFERIU ESTATÍSTICAMENTE DOS AMERÍNDIOS EM RELAÇÃO AO CONJUNTO TOTAL DE GENES E AO CONJUNTO DE GENES ATIVADORES, MAS APRESENTOU SEMELHANÇAS EM RELAÇÃO AO CONJUNTO DE GENES INIBIDORES (ESCURO). BARI E HUILLICHES DIFERIRAM DE CURITIBA EM RELAÇÃO AOS GENES INIBIDORES, MAS APRESENTARAM VALORES DE P PRÓXIMOS DO LIMIAR DE SIGNIFICÂNCIA (0,038 E 0,048 RESPECTIVAMENTE) (1, 5 AND 8 = MIDDLETON ET AL., 2008; 2, 13 AND 14 = FLORES ET AL., 2007; 3 = DENIS ET AL., 2005; 4 = YAWATA ET AL., 2006; 5 = BONTADINI ET AL., 2006; 6 = MIDDLETON ET AL., 2007; 7 = DU ET AL., 2007; 9 = GUTIERREZ-RODRIGUEZ ET AL., 2006; 10, 11 AND 12 = GENDZEKHADZE ET AL., 2006).

TABELA 7 – FREQUÊNCIAS DO GRUPO ALÉLICO FUNCIONAL E GRUPO NÃO FUNCIONAL DE *2DS4*.

	Curitiba		França		Senegal	
	F (%)	gf	F (%)	Gf	F (%)	Gf
<i>Grupo alélico funcional</i>	54	0,27	31	0,17	83	0,59
<i>Grupo alélico não funcional</i>	75	0,50	84	0,60	48	0,28

F = FREQUENCIA DE PRESENÇA; GF = FREQUÊNCIA DO GRUPO ALÉLICO. (DENIS ET AL., 2005)

TABELA 8 – PERFIS GÊNICOS (FENÓTIPOS) ENCONTRADOS EM CURITIBA

#	ID	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	NG	N	F
1	1																7	38	28.8
2	4																9	18	13.6
3	2																11	13	9.8
4	5																11	10	7.6
5	3																13	8	6.1
6	7																13	6	4.5
7	71																10	5	3.8
8	6																14	4	3.0
9	73																13	3	2.3
10	70																12	3	2.3
11	104																7	2	1.5
12	81																11	2	1.5
13	27																10	2	1.5
14	15																8	2	1.5
15	86																12	2	1.5
16	11																12	2	1.5
17	9																12	2	1.5
18	45																11	1	0.8
19	188																10	1	0.8
20	106																10	1	0.8
21	58																13	1	0.8
22	174																11	1	0.8
23	216																11	1	0.8
24	171																7	1	0.8
25	89																8	1	0.8
26	69																9	1	0.8
27	new																8	1	0.8

CAIXAS PRETAS REPRESENTAM A PRESENÇA DO GENE E AS BRANCAS, AUSÊNCIA. OS GENES ESTÃO LISTADOS CONFORME A ORDEM NO CROMOSSOMO. CADA PERFIL REPRESENTA OS GENES QUE O INDIVÍDUO POSSUI, INDEPENDENTE DO NÚMERO DE CÓPIAS DE CADA GENE OU DOS HAPLÓTIPOS QUE FORMAM CADA PERFIL. “GRUPO” = GENÓTIPO CONSIDERANDO HAPLOGRUPOS A E B; ID = O NÚMERO DO PERFIL QUE ESTÁ CATALOGADO ON-LINE NO “ALLELEFREQUENCIES.NET” (MIDDLETON, 2003); NG = NÚMERO DE GENES POR PERFIL; N = NÚMERO DE PORTADORES; F = FREQUÊNCIA RELATIVA.

5.5 INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS

A partir de métodos de inferência descritos, 25 haplótipos foram encontrados na amostra populacional em estudo (TABELA 9), dos quais 20 já foram encontrados anteriormente em estudos de segregação em famílias (KHAKOO e CARRINGTON, 2006). Os outros 5 haplótipos foram inferidos a partir de combinações possíveis considerando conhecimentos prévios sobre desequilíbrio de ligação entre locos *KIR*. Esse grupo de 5 haplótipos representa apenas 3% dos haplótipos da amostra.

5.6 DISTÂNCIAS GENÉTICAS

As distâncias genéticas e o dendrograma, na maioria dos casos, apresentaram consistência com os grupos étnicos e geográficos (FIGURA 8). Europeus e euro-descendentes se agruparam, mas subdivididos. As duas populações mais divergentes foram a de africanos quando comparada com ameríndios e asiáticos. As populações asiáticas permaneceram agrupadas, com exceção de duas populações de ascendência asiática que residem em outros continentes (asiáticos residentes nos EUA e Trinidad – África) e uma população da cidade de Karachi (Paquistão). Populações indígenas mexicanas, venezuelanas e argentinas formaram um único grupo, exceto Wichi de Salta, Argentina, que ficou separada dos demais ameríndios. Mestiços mexicanos, de ascendência predominantemente européia, agruparam-se com euro-descendentes, mas essa foi a população mais divergente do grupo. Finlândia e Norte-Americanos de ascendência predominantemente européia (USACaucas) não se agruparam com populações de mesma ancestralidade. Todas as populações utilizadas no dendrograma estão listadas e referenciadas na TABELA 10.

5.7 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Foi encontrado desequilíbrio de ligação significativo ou ($p < 0,05$) em 39 pares de locos (FIGURA 9). Os valores de desequilíbrio positivo mais elevado foi observado entre os pares *2DL5-2DPI* ($D' = 0,86$). Os valores de desequilíbrio negativo mais elevados foi encontrados, não surpreendentemente, para o par de alelicos *3DL1-3DS1* ($D' = -0,66$). Outro par alélico, *2DL2-2DL3* também mostrou valor de desequilíbrio negativo elevado ($D' = -0,37$).

TABELA 9 – POSSÍVEIS HAPLÓTIPOS PRESENTES NA AMOSTRA POPULACIONAL DE CURITIBA.

Haplotype	Freq	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1
1	0.5231															
2	0.1251															
3	0.0957															
14	0.0352															
6	0.0352															
7	0.0330															
15	0.0292															
18a	0.0160															
9	0.0116															
H40	0.0099															
11	0.0091															
10	0.0090															
40	0.0090															
H24	0.0088															
24	0.0087															
31	0.0078															
5	0.0077															
32a	0.0066															
17	0.0058															
H33	0.0053															
23	0.0053															
42	0.0013															
18b	0.0011															
H20	0.0003															
H23	0.0001															

CAIXAS PRETAS REPRESENTAM A PRESENÇA DO GENE E AS BRANCAS, AUSÊNCIA. OS GENES ESTÃO LISTADOS CONFORME A ORDEM NO CROMOSSOMO. A COMBINAÇÃO DE DOIS HAPLÓTIPOS EM UM MESMO INDIVÍDUO RESULTA NO PERFIL GÊNICO. OS ÚLTIMOS SEIS HAPLÓTIPOS NÃO FORAM ENCONTRADOS PREVIAMENTE EM ESTUDOS DE SEGREGAÇÃO EM FAMÍLIAS (KHAKOO E CARRINGTON, 2006)

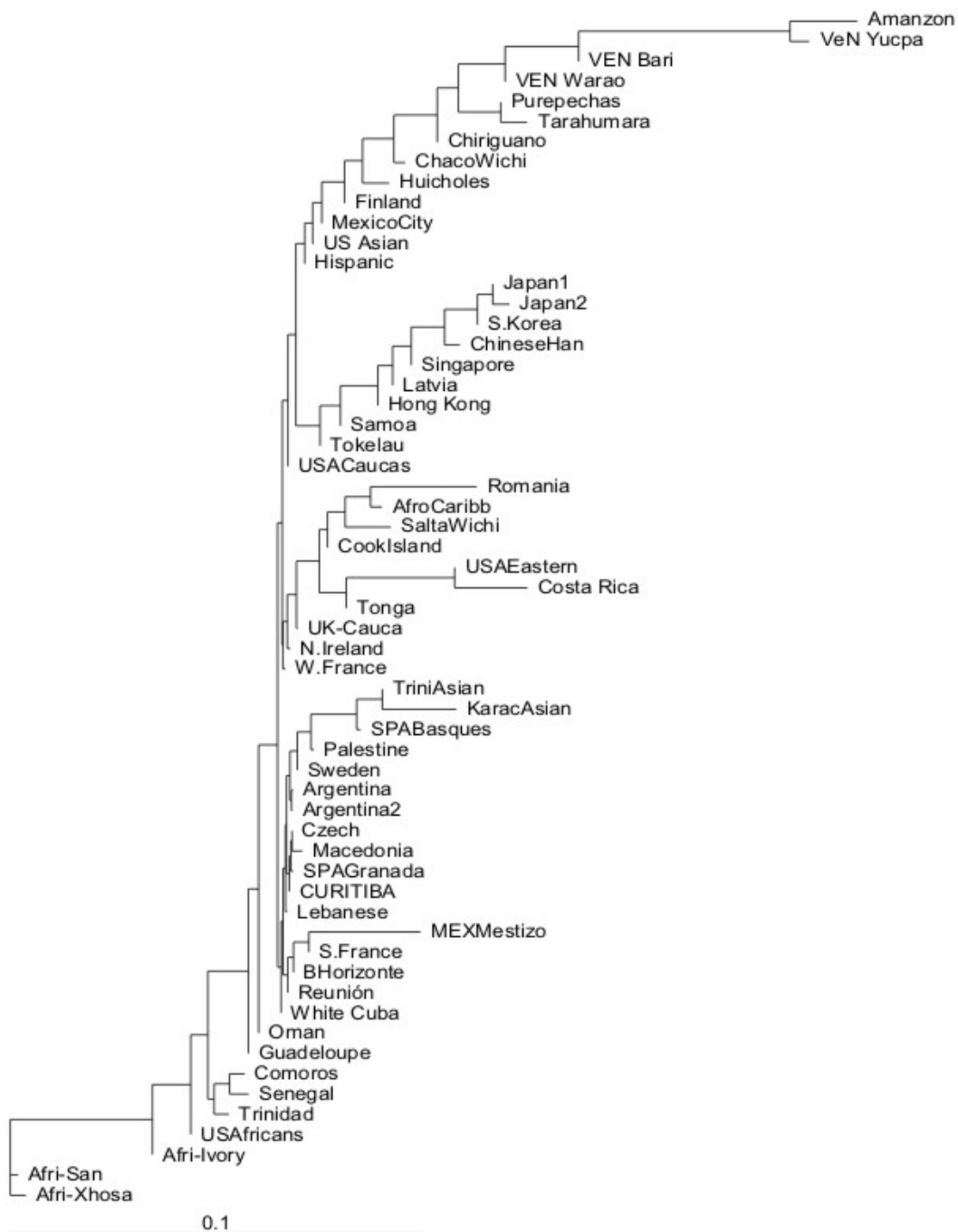


FIGURA 8 – DISTÂNCIAS GENÉTICAS ESTIMADAS PELO MÉTODO DE NEI ENTRE 59 POPULAÇÕES DE DIVERSOS LOCAIS DO MUNDO VISUALIZADA EM UM DENDROGRAMA NEIGHBOR-JOINING.

TABELA 10 – POPULAÇÕES DO DENDROGRAMA

Nome no dendrograma	Nome e tamanho da população	Referência
Amazon	Ameríndios da Amazônia	(EWERTON et al., 2007)
Argentina	Argentina 102	Dados não publicados *
Argentina 2	Argentina, Buenos Aires 365	(FLORES et al., 2007)
Chaco Wichi	Ameríndios da Argentina, Chaco Wichis 82	(FLORES et al., 2007)
Chiriguano	Ameríndios da Argentina, Chiriguano 54	(FLORES et al., 2007)
Salta Wichi	Ameríndios da Argentina, Salta Wichis 19	(FLORES et al., 2007)
Czech	República Tcheca	(PAVLOVA et al., 2008)
Bhorizonte	Brasil Belo Horizonte 90	(MIDDLETON et al., 2008)
Chinese Han	China, Zhejiang Han 104	(JIANG et al., 2005)
Comoros	Comarões 54	(FRASSATI et al., 2006)
CookIsland	Ilhas Cook 48	(MIDDLETON et al., 2008)
Costa Rica	Costa Rica, Guanacaste 117	(CARRINGTON et al., 2005)
White Cuba	Euro-descendentes de Cuba 70	(MIDDLETON et al., 2008)
Curitiba	Euro-descendentes de Curitiba 153	Presente estudo
UK-Cauca	Euro-descendentes do Reino Unido 126	(COOK, MOSS e BRIGGS, 2003)
AfroCaribb	Afro Caribenhos 54	(COOK, MOSS e BRIGGS, 2003)
Finland	Finlândia, Helsinki 101	(DENIS et al., 2005)
S. France	France, sudeste pop2 38	(FRASSATI et al., 2006)
W. France	France oeste 108	(DENIS et al., 2005)
Guadeloupe	Guadalupe 118	(DENIS et al., 2005)
Hong Kong	China, Hong Kong 100	(MIDDLETON et al., 2008)
N. Ireland	Irlanda do Norte pop2 154	(MIDDLETON et al., 2007)
Afri-Ivory	Costa Ivory, Abidjan 25	(JENNES et al., 2006)
Japan1	Japão 41	(YAWATA et al., 2002)
Japan2	Japão 132	(YAWATA et al., 2006)
Latvia	Latvia 98	(NIKITINA-ZAKE et al., 2004)
Lebanese	Líbano 120	(MAHFOUZ et al., 2006)
Macedonia	Macedônia 120	Dados não publicados *
Mexico City	Cidade do México, Mestiços 86	(GUTIERREZ-RODRIGUEZ et al., 2006)
Huicoles	México Huicholes 73	(GUTIERREZ-RODRIGUEZ et al., 2006)
Purepechas	México Purepechas 53	(GUTIERREZ-RODRIGUEZ et al., 2006)
Tarahumara	México Tarahumara 65	(GUTIERREZ-RODRIGUEZ et al., 2006)
MEX Mestizo	México Veracruz Mestizos 51	(CONTRERAS et al., 2007)
Oman	Oman 99	(MIDDLETON et al., 2008)
KaracAsian	Paquistaneses de Karachi 78	(NORMAN et al., 2002)
Palestine	Palestinos, Jordan 105	(NORMAN et al., 2001)
Reunion	Reúnião 101	(DENIS et al., 2005)
Romania	Euro-descendentes da Romênia 123	Dados não publicados *
Samoa	Samoa 50	(VELICKOVIC, VELICKOVIC e DUNCKLEY, 2006)
Senegal	Senegal 90	(DENIS et al., 2005)
Singapore	Chineses de Singapura 47	(MIDDLETON et al., 2008)
Afri-San	Sul-Africanos, San 91	(MIDDLETON et al., 2008)
Afri-Xhosa	Sul-Africanos, Xhosa 50	(MIDDLETON et al., 2008)
S. Korea	Coreia do Sul 154	(WHANG et al., 2005)
SPABasques	Espanha, Bascos 71	(SANTIN et al., 2006)
SPAGranada	Espanha, Granada 100 WS	(MIDDLETON et al., 2008)
Sweden	Suécia, Vasterbotten 150	(ARNHEIM, DILLNER e SANJEEVI, 2005)
Tokelau	Tokelau 47	(MIDDLETON et al., 2008), 2006
Tonga	Tonga 49	(MIDDLETON et al., 2008)
Trinidad	Africanos de Trinidad 62	(NORMAN et al., 2002)
TriniAsian	Sul asiáticos de Trinidad 108	(NORMAN et al., 2002)
US Africans	Africanos americanos da Califórnia 58	(DU et al., 2007)
US Asian	Asiáticos americanos da Califórnia 150	(DU et al., 2007)
USAEastern	Euro-descendentes dos EUA 213	(CARRINGTON et al., 200)
US Caucas	Euro-descendentes da Califórnia, EUA 195	(DU et al., 2007)
Hispanic	Hispânicos da Califórnia 128	(DU et al., 2007)
VEN Bari	Ameríndios da Venezuela, Bari 80	(GENDZEKHADZE et al., 2006)
VEN Warao	Ameríndios da Venezuela, Warao 89	(GENDZEKHADZE et al., 2006)
VEN Yucpa	Ameríndios da Venezuela, Yucpa 61	(GENDZEKHADZE et al., 2006)

* DADOS NÃO PUBLICADOS, DISPONÍVEL NO ALLELEFREQUENCIES.NET (MIDDLETON, 2005).

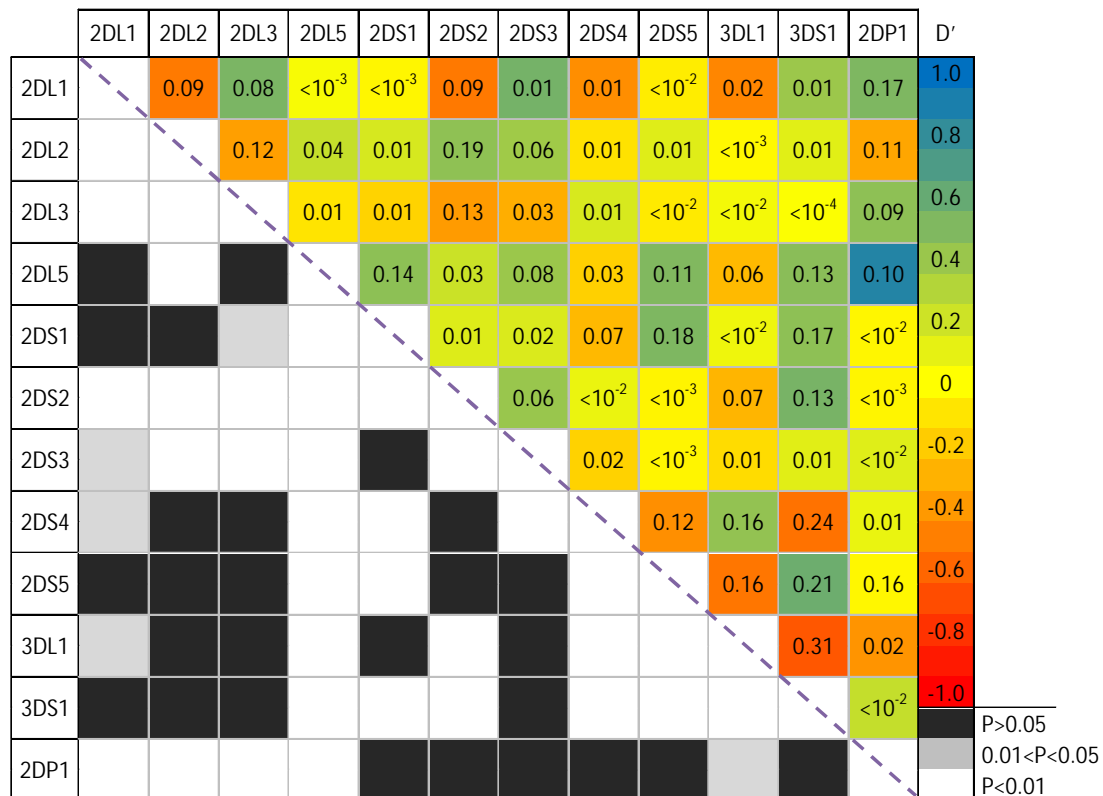


FIGURA 9 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE PARES DE GENES *KIR*.

A LINHA PONTILHADA DIVIDE A FIGURA EM DUAS PARTES: ACIMA, AS CORES INFORMAM OS VALORES DE D' SEGUINDO A ESCALA DE COR À DIREITA. DENTRO DAS CAIXAS COLORIDAS ESTÃO ESCRITOS OS VALORES DE R²; ABAIXO, VALORES DE P ESTÃO REPRESENTADOS EM CORES DE ACORDO COM A ESCALA DE VALORES À DIREITA.

5.8 LIGANTES HLA

A TABELA 11 mostra as frequências observadas de ligantes HLA dos receptores KIR. Homozigotos *C1/C1* corresponderam a 43,8% enquanto os genótipos *C1/C2* e *C2/C2* foram encontrados em frequências de 27,0% e 29,2% respectivamente. Homozigotos *Bw4* representaram 15,9% e heterozigotos representaram 42,8% dos indivíduos testados. Nós chamamos de ligantes funcionais aqueles cujos receptores *KIR* estão presentes no indivíduo. Assim, se um indivíduo tem 2DL2, mas não 2DL1 e possui ambos os ligantes C1 e C2, esse tem apenas um ligante funcional (C1), em vista da ausência do receptor para C2, 2DL1, nesse indivíduo. A população em estudo apresentou uma média de 3,2 ligantes funcionais por indivíduo e cada indivíduo tem ao menos dois ligantes funcionais. Todos os ligantes e seus respectivos receptores tiveram suas frequências distribuídas independentemente (dados não mostrados).

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE LIGANTES HLA

Ligantes	Frequências	Portadores(%)
C1	0.573	70.8
C2	0.427	54.7
<i>Bw4 (HLA-B)</i>	0.371	56.3
<i>Bw4-80I (HLA-B)</i>	0.211	35.2
<i>Bw4-80I (HLA-A)</i>	0.211	35.1

6 DISCUSSÃO

A população de Curitiba apresentou frequências dos genes *KIR* semelhantes às de outras populações de ascendência européia, o que era esperado considerando a origem predominantemente européia da população em estudo. O gene inibidor *2DL3*, contudo, apresentou maior heterogeneidade entre populações européias (dados não mostrados) e foi diferente significativamente comparando Curitiba e outras populações européias ou euro-descendentes, incluindo a amostra populacional brasileira de Belo Horizonte, Minas Gerais ($p = 0,004$) e França ($p = 0,001$). A frequência de *2DL2* encontrada em Curitiba também diferiu da frequência encontrada na população francesa ($p < 10^{-5}$). A razão para essa heterogeneidade não está clara, entretanto, é possível que esteja relacionada com a suposta função redundante desses dois genes, que são considerados alelos do mesmo loco e ambos codificam receptores que reconhecem ligantes HLA-C do grupo C1. Portanto, *2DL2* e *2DL3* podem estar expostos a uma mais baixa pressão seletiva quando comparada a outros genes inibidores. O relaxamento de seleção natural poderia permitir flutuações de suas frequências devido a fatores demográficos. Essa hipótese ainda reafirma a importância da seleção natural para a manutenção de frequências dos outros genes *KIR*. Por outro lado, a heterogeneidade das frequências desses alelos pode ser resultado de dificuldades na genotipagem através do método SSP. Os genes *KIR* são muito semelhantes em sequência e problemas causados por amplificação inespecífica podem ocorrer. Na tentativa de diminuir erros de genotipagem, controles adequados e aplicação de métodos que apresentem resultados redundantes são importantes, como o uso de mais de um par de oligonucleotídeos iniciadores para cada gene. Além disso, nesse estudo, todos os resultados duvidosos ou que não houve concordância entre os pares de oligonucleotídeos foram repetidos várias vezes e fez-se uso de um controle interno de PCR que amplifica um gene não *KIR*. Portanto, consideramos improvável que as diferenças sejam devidas a problemas de tipagem em nosso estudo.

Comparando a estimativa de frequências dos “genes alélicos” pelas duas abordagens utilizadas – considerando que são genes ou alelos do mesmo loco – encontramos diferenças entre as frequências de *2DL3* e *3DS1* (TABELA 1). Em vista dos conhecimentos anteriores a respeito dos haplótipos *KIR* (UHRBERG, PARHAM e WERNET, 2002), acreditamos que a estimativa que os considera alelos do mesmo loco

seja a maneira correta para estimativa das frequências, uma vez que eles segregam de forma mendeliana.

A similaridade entre Curitiba e outras populações européias ou de ancestralidade predominantemente européia também foi observada tanto para as frequências de todo o conjunto de genes quanto para os subgrupos de genes inibidores e de genes ativadores. Para esse mesmo conjunto e subgrupos, a população de Curitiba difere de populações asiáticas e ameríndias (TABELA 2). Interessantemente, as frequências dos genes inibidores foram semelhantes entre Curitiba e populações ameríndias. Outros estudos já mostraram que as frequências dos genes inibidores normalmente são maiores e distribuídas mais homogeneamente entre populações do que as frequências dos genes ativadores. Assim, os genes inibidores parecem ser mais importantes que os ativadores na atividade normal do organismo e no controle da homeostase (PARHAM, 2005), fato esse relacionado com a importância dos sinais inibidores na regulação da função das células NK. Para demonstrar a maior homogeneidade inter-populacional e frequências mais elevadas dos genes inibidores são verdadeiras, obtivemos todas as frequências dos genes *KIR* de populações européias ou euro-descendentes publicados no “Allele frequencies.net” (MIDDLETON et al., 2003) e colocamos na forma de gráficos (FIGURA 10). É possível visualizar que, com exceção de *2DL2* e *2DL5*, comuns nos haplótipos do haplogrupo B, os genes *KIR* inibidores são distribuídos mais homogeneamente e ocorrem em frequências mais altas que os ativadores. Outra evidência da menor importância dos genes ativadores é a alta frequência do grupo de alelos não funcionais do gene *2DS4*, único ativador de cauda curta do frequente haplogrupo A. Assim como em outras populações já estudadas, Curitiba apresentou alta frequência desse grupo alélico. Enquanto o grupo não funcional ocorre em alta frequência em europeus e euro-descendentes, em Senegal sua frequência é mais baixa. Além disso, as frequências dos grupos alélicos de *2DS4* foram estatisticamente diferentes quando comparamos Curitiba e França ($p = 0,03$). O haplogrupo A é muito frequente na maioria das populações estudadas e devido à alta frequência da deleção de 22pb em *2DS4*, muitos indivíduos sequer apresentam genes inibidores de cauda curta funcionais em seu repertório KIR (WITT et al., 1999; HSU et al., 2002). Por outro lado, todos os indivíduos até hoje analisados apresentaram genes *KIR* inibidores, sugestão de que os genes ativadores são mais dispensáveis que os inibidores (PARHAM, 2005). Nós estimamos que 33% dos homozigotos para o haplogrupo A

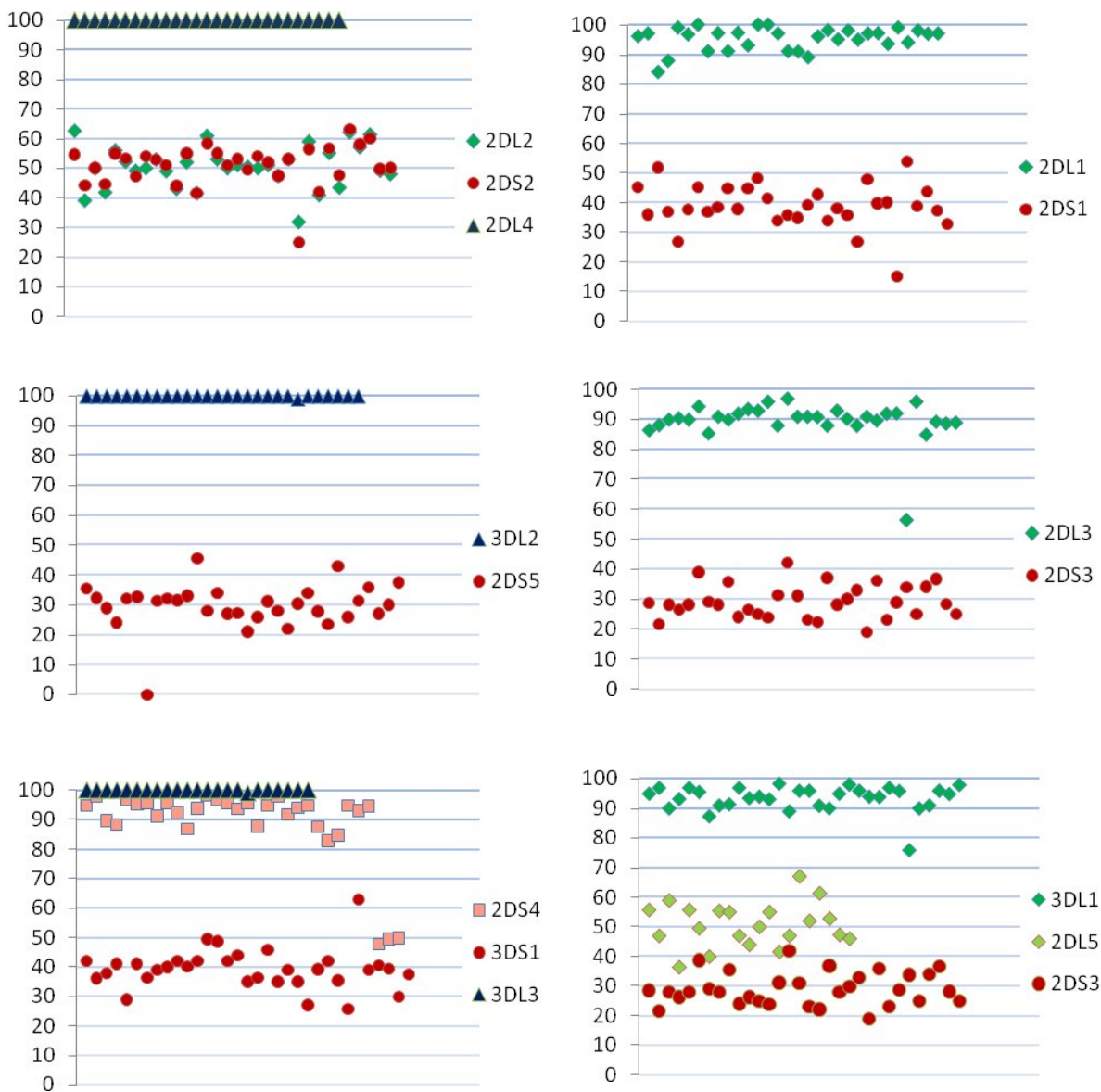


FIGURA 10 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PRESENÇA DOS GENES *KIR* EM POPULAÇÕES EUROPEIAS E EURO-DESCENDENTES. OS NÚMEROS À ESQUERDA REPRESENTAM A FREQUÊNCIA EM PORCENTAGEM. FORAM UTILIZADAS TODAS AS POPULAÇÕES EUROPEIAS OU EURO-DESCENDENTES ENCONTRADAS NO “ALLELEFREQUENCIES.NET” EM OUTUBRO DE 2008 E CADA PONTO DO GRÁFICO REPRESENTA UMA DESSAS POPULAÇÕES.

desse estudo são também homozigotos para o grupo alélico não funcional de *2DS4*, o que representa 7,9% da população. Ainda, a deleção de *2DS4*, que resulta em duas bandas de diferentes tamanhos na visualização em gel de agarose auxilia na elucidação e inferência de haplótipos, já que é possível identificar indivíduos heterozigotos que apresentam o grupo alélico funcional em um cromossomo e o não funcional em outro. Assim, através da tipagem, podemos saber se alguns indivíduos apresentam o gene *2DS4* nos dois cromossomos, o que não é possível para os outros genes devido à recessividade da ausência do gene.

Perfis *KIR* podem ajudar na compreensão das relações entre populações. Alguns perfis são característicos de certas populações e seus descendentes ou certos grupos de populações. Nossos resultados revelaram que apesar de um grande número de perfis gênicos encontrados (27), apenas oito desses representam 77,5% da diversidade de perfis da amostra (TABELA 8). Analisando esses perfis dessa amostra, verificamos que o perfil resultante do genótipo homozigoto A/A teve frequência semelhante a outras populações de ancestralidade européia. Também observamos alguns perfis em baixa frequência, que não são comuns em populações dessa ancestralidade. O perfil 18 (ID 45) foi encontrado em apenas dois indivíduos da população africana de Trinidad (NORMAN et al., 2002); o perfil 22 (ID 174) foi encontrado apenas em ameríndios da Amazônia (EWERTON et al., 2007) e em uma população indiana (RAJALINGAM et al., 2002); o perfil 23 (ID 216) foi encontrado em apenas dois indivíduos de uma população sueca (ARNHEIM, DILLNER e SANJEEVI, 2005); os perfis 19 (ID 188), 20 (ID106), 21 (ID58), 24 (ID 171), 25 (ID 89) e 26 (ID 69) não são frequentes em europeus ou euro-descendentes, sendo característicos de africanos, ameríndios ou populações outras de diferentes partes do mundo. A presença desses perfis na população de Curitiba pode ser explicada pela ancestralidade dessa população: europeus (portugueses, italianos, poloneses, alemães, ucranianos e outros), africanos e indígenas que viviam na América do Sul antes da colonização (PROBST et al., 2000). Portanto, embora a população em estudo seja de ascendência predominantemente européia, ainda assim é uma população miscigenada. Resultados em dois trabalhos do nosso grupo de pesquisa, além de resultados não publicados, mostraram que a ancestralidade dessa população é de aproximadamente 87% européia, 8% africana e 5% indígena (BRAUN-PRADO et al., 2000; PROBST et al., 2000). Portanto, a presença de perfis incomuns em europeus e uma maior diversidade do que observada naquelas populações não é inesperada.

Os haplótipos poderiam ser ainda mais informativos como marcadores de ancestralidade, mas a recessividade da ausência dos genes *KIR* resulta em dificuldades na inferência haplotípica. Análise de segregação (UHRBERG, PARHAM e WERNET, 2002), é um método confiável para inferir haplótipos, mas limitado, devido à necessidade de uma grande amostra de famílias informativas. Neste estudo, foi utilizado um novo programa computacional chamado Haplo-IHP, que mostrou eficácia na inferência de haplótipos *KIR*. Segundo os autores, esse programa é mais eficiente que os demais já desenvolvidos (YOO et al., 2007). Após a inferência dos haplótipos com auxílio desse programa, os perfis foram analisados manualmente, para cada indivíduo. Baseados em conhecimentos anteriores a respeito da diversidade *KIR* e do polimorfismo haplotípico, alguns haplótipos foram descartados e alguns dos haplótipos inferidos devem ser validados em estudos subseqüentes. Alguns haplótipos que são classificados como heterozigotos A/B segundo o Allele frequencies.net (MIDDLETON et al., 2003) após serem cuidadosamente analisados e com base na inferência haplotípica, parecem ser homozigotos B/B. Por definição, haplótipos B são aqueles que apresentam ao menos um dos seguintes genes: *2DL2*, *2DL5*, *2DS1*, *2DS3*, *2DS3*, *2DS5* e *3DS1*. Alguns haplótipos do grupo B, entretanto, diferenciam-se dos haplótipos do grupo A apenas pela presença de um único genes específico do grupo B (KHAKOO e CARRINGTON, 2006). A frequência dos haplogrupos A e B foram estimadas por duas abordagens: assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg e por contagem direta após a inferência dos haplótipos e correção da classificação dos perfis. As duas estimativas foram muito similares: 48,8% e 48,5% respectivamente.

Os valores de desequilíbrio de ligação para os pares de genes *KIR* podem variar entre populações (GUTIERREZ-RODRIGUEZ et al., 2006; KULKARNI et al., 2008). Como esperado, os alelos *2DL2* e *2DL3* mostraram desequilíbrio de ligação negativo ($D' = -0,37$), mas não tão elevado como o outro par de alelos, *3DL1* e *3DS1* ($D' = -0,67$). Entretanto, alguns haplótipos em que ambos os alelos do par estão presentes já foram descritos (KHAKOO e CARRINGTON, 2006) e alguns perfis raros em que há ausência dos dois alelos de um dos pares já foram catalogados no Allele frequencies.net. A existência desses perfis ainda deverá ser verificada, pois erros de genotipagem não podem ser descartados, possibilidade essa reforçada pelo fato de alguns dos perfis terem sido descritos em apenas uma população e em um único indivíduo.

O dendrograma baseado nas distancias genéticas (FIGURA 8) reflete as similaridades e diferenças da distribuição de frequências dos genes *KIR* entre

populações. É importante frisar que dendrogramas como esse não refletem a história biológica das populações já que para isso é necessário muito mais do que o estudo de uma única família gênica. O agrupamento de certas populações pode ser fruto de miscigenação, seleção natural e deriva genética, além de outros fatores evolutivos estocásticos, e não necessariamente de ancestralidade comum das populações. Entretanto, o dendrograma é informativo no sentido de mostrar que a ancestralidade comum é o fator principal para a distribuição dos genes e suas frequências entre populações, (na maioria dos agrupamentos é comum também encontrar populações que compartilham mesma ancestralidade), seguido por fluxo gênico e possivelmente outros fatores demográficos. Curitiba se agrupou com Argentina, República Tcheca, Espanha, outras populações do mediterrâneo, entre outras. Orientais ficaram próximos dos mexicanos e populações ameríndias, como esperado considerando que a ancestralidade comum é o principal fator responsável pelas frequências semelhantes de genes *KIR*. Wichis de Salta são os únicos indígenas que não se agruparam com os demais, ficando próximos dos afro-caribenhos. Entretanto, o tamanho amostral muito pequeno dessa população indígena ($N = 19$) pode ter contribuído para o distanciamento dessa população indígena das demais, devido ao erro da estimativa das frequências. Africanos mostraram a maior diversidade inter-populacional, pois apesar de estarem distantes e separadas das demais, não estão reunidas em um único grupo.

A análise das combinações *KIR-HLA*, considerando receptores *KIR* e seus ligantes, revelaram que eles estão distribuídos independentemente (resultados não mostrados), portanto, não foi encontrada evidência de co-evolução por seleção natural. Entretanto, é importante lembrar que, para uma associação estatisticamente significativa ser observada em um estudo populacional como esse, a pressão seletiva deveria ser bastante pronunciada. Através de outra abordagem, analisando muitas populações de diferentes continentes, foram encontradas correlações negativas de frequências entre genes *KIR* ativadores e as frequências de seus ligantes, interpretados como uma evidência da ação da seleção natural (SINGLE et al., 2007; KULKARNI et al., 2008). Devido ao fato de tanto *KIR* quanto *HLA* serem altamente polimórficos e essas duas famílias gênicas segregarem independentemente, um indivíduo poderia não ter ligantes para um receptor ou vice-versa. Verificamos que nessa população todos os indivíduos apresentam ao menos uma combinação *KIR-HLA* funcional. Se não encontramos evidências de correlação de frequências *KIR-HLA* como indicativo de seleção natural,

por outro lado, a ausência de indivíduos sem ligantes KIR funcionais provavelmente não é casual.

Apesar do elevado grau de polialelismo no loco *HLA-B*, as moléculas HLA-B podem ser subdivididas em dois grupos, por apresentarem um dos dois epítomos denominados Bw4 ou Bw6. O primeiro é o ligante para os produtos dos “genes alélicos” *3DL1* e *3DS1*, enquanto Bw6 não interage com qualquer receptor KIR. Entre as moléculas HLA com epítomos Bw4, as que apresentam isoleucina na posição 80 (Bw4-80I) têm maior afinidade pelo receptor que as moléculas com treonina na mesma posição. Interessantemente, algumas moléculas HLA-A também apresentam o epítomo Bw4 e também podem servir como ligantes dos mesmos receptores. Estas moléculas HLA-A são A23, A24, A2403, A25 e A32. Todas elas apresentam o epítomo com maior afinidade pelos receptores KIR, Bw4-80I (CELLA et al., 1994; CARR, PANDO e PARHAM, 2005). Na população analisada, observamos a mesma frequência de Bw4-80I provenientes dos locos *HLA-A* e *HLA-B* (0,211). Dos indivíduos que apresentaram ausência de Bw4 de HLA-B, 45% apresentaram Bw4 de HLA-A. Portanto, esses dois genes provavelmente são igualmente importantes na função de reconhecimento por parte das células NK.

7 CONCLUSÃO

A população de Curitiba é semelhante a outras populações européias ou euro-descendentes, mas, ainda assim, uma população miscigenada, com maior diversidade de perfis e haplótipos, sendo alguns comuns em populações africanas e indígenas. Os haplogrupos A e B apresentaram 54% e 46%. O grupo alélico não funcional de *2DS4* apresentou alta frequência e cerca de 7,9% da população não apresenta genes *KIR* ativadores de cauda curta funcionais. Obtivemos 27 diferentes perfis e 25 haplótipos, sendo que destes, alguns deverão ser validados em estudos subseqüentes. Não foram encontrados indivíduos com ausência de ligantes *KIR* funcionais. No dendrograma, em que Curitiba se agrupou com populações européias e euro-descendentes, foi evidenciado que a ancestralidade é o fator principal para que as populações tenham sido agrupadas, reflexo das similaridades e diferenças entre as frequências dos genes *KIR*. As frequências de ligantes e receptores estão distribuídas independentemente, resultado compatível com pressão seletiva favorável a certas combinações baixa ou mesmo nula. Além de HLA-B, HLA-A também apresentou em alta frequência moléculas com o epítipo Bw4 que são ligantes dos “genes alélicos” *3DL1* e *3DS1*. Estudos populacionais não somente fornecem o fundamento para estudos evolutivos, mas também podem ajudar para a compreensão da variação normal desses genes, o que poderá servir como base para outros estudos. Podem colaborar na compreensão de como a ausência ou presença de certos receptores *KIR* e de combinações *KIR*-HLA contribuem para a patogênese de doenças complexas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNHEIM, L.; DILLNER, J. e SANJEEVI, C. B. A population-based cohort study of KIR genes and genotypes in relation to cervical intraepithelial neoplasia. **Tissue Antigens**, Copenhagen , v. 65, p. 252-259, 2005.

BALLAS, Z. K.; RASMUSSEN, W. L. e KRIEG, A. M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. **J Immunol**, Baltimore, MD, v. 157, p. 1840-1845, 1996.

BIRON, C. A. e BROSSAY, L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. **Curr Opin Immunol**, Londres , v. 13, p. 458-464, 2001.

BIRON, C. A.; NGUYEN, K. B.; PIEN, G. C.; COUSENS, L. P. e SALAZAR-MATHER, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu Rev Immunol**, Nova Iorque, v. 17, p. 189-220, 1999.

BONTADINI, A.; TESTI, M.; CUCCIA, M. C.; MARTINETTI, M.; CARCASSI, C.; CHIESA, A.; COSENTINI, E.; DAMETTO, E.; FRISON, S.; IANNONE, A. M.; LOMBARDO, C.; MALAGOLI, A.; MARIANI, M.; MARIOTTI, L.; MASCARETTI, L.; MELE, L.; MIOTTI, V.; NESCI, S.; OZZELLA, G.; PIANCATELLI, D.; ROMEO, G.; TAGLIAFERRI, C.; VATTA, S.; ANDREANI, M. e CONTE, R. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. **J Transl Med**, Londres, v. 4, p. 44-2006.

BRAUN-PRADO, K.; VIEIRA MION, A. L.; FARAH, P. N.; CULPI, L. e PETZL-ERLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, Londres , v. 56, p. 417-427, 2000.

BROWN, M. G.; SCALZO, A. A.; STONE, L. R.; CLARK, P. Y.; DU, Y.; PALANCA, B. e YOKOYAMA, W. M. Natural killer gene complex (Nkc) allelic variability in inbred mice: evidence for Nkc haplotypes. **Immunogenetics**, Nova Iorque, v. 53, p. 584-591, 2001.

CARR, W. H.; PANDO, M. J. e PARHAM, P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. **J Immunol**, Baltimore, MD , v. 175, p. 5222-5229, 2005.

CARRINGTON, M. e NORMAN, P. J. The KIR gene cluster. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mono_003 chapter 1, v. acessado em 10/11/2006 às 17h, 2003.

CARRINGTON, M.; WANG, S.; MARTIN, M. P.; GAO, X.; SCHIFFMAN, M.; CHENG, J.; HERRERO, R.; RODRIGUEZ, A. C.; KURMAN, R.; MORTEL, R.; SCHWARTZ, P.; GLASS, A. e HILDESHEIM, A. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. **J Exp Med**, Nova Iorque , v. 201, p. 1069-1075, 2005.

CELLA, M.; LONGO, A.; FERRARA, G. B.; STROMINGER, J. L. e COLONNA, M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. **J Exp Med**, Nova Iorque, v. 180, p. 1235-1242, 1994.

CHAN, H. W.; MILLER, J. S.; MOORE, M. B. e LUTZ, C. T. Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. **J Immunol**, Baltimore, MD , v. 175, p. 5966-5974, 2005.

COLUCCI, F.; DI SANTO, J. P. e LEIBSON, P. J. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? **Nat Immunol**, Nova Iorque , v. 3, p. 807-813, 2002.

CONTRERAS, G.; ALAEZ, C.; MURGUÍA, A.; GARCIA, D.; FLORES, H. e GORODEZKY, C. Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. **Tissue Antigens**, Kopenhagen , v. 69, p. 125-129, 2007.

COOK, M. A.; MOSS, P. A. e BRIGGS, D. C. The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor loci in UK blood donors from three ethnic groups. **Eur J Immunogenet**, Londres , v. 30, p. 213-221, 2003.

COOK, M. A.; MILLIGAN, D. W.; FEGAN, C. D.; DARBYSHIRE, P. J.; MAHENDRA, P.; CRADDOCK, C. F.; MOSS, P. A. e BRIGGS, D. C. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. **Blood**, Londres, v. 103, p. 1521-1526, 2004.

CRUM, K. A.; LOGUE, S. E.; CURRAN, M. D. e MIDDLETON, D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. **Tissue Antigens**, Kopenhagen, v. 56, p. 313-326, 2000.

DENIS, L.; SIVULA, J.; GOURRAUD, P. A.; KERDUDOU, N.; CHOUT, R.; RICARD, C.; MOISAN, J. P.; GAGNE, K.; PARTANEN, J. e BIGNON, J. D. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. **Tissue Antigens**, Kopenhagen, v. 66, p. 267-276, 2005.

DU, Z.; GJERTSON, D. W.; REED, E. F. e RAJALINGAM, R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. **Immunogenetics**, Nova Iorque, v. 59, p. 1-15, 2007.

DUPONT, B.; SELVAKUMAR, A. e STEFFENS, U. The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4. **Tissue Antigens**, Kopenhagen, v. 49, p. 557-563, 1997.

EWERTON, P. D.; LEITE, M. M.; MAGALHAES, M.; SENA, L. e MELO DOS SANTOS, E. J. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. **Immunogenetics**, Nova Iorque, v. 59, p. 625-630, 2007.

EXCOFFIER; LAVAL, L. G. e SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinform Online**, Auckland, NZ, p. 47-50, 2005.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.2. **Cladistics**, v. 5, p. 164-166, 1989.

FLODSTROM, M.; SHI, F. D.; SARVETNICK, N. e LJUNGGREN, H. G. The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease? **Scand J Immunol**, Baltimore, MD, v. 55, p. 432-441, 2002.

FLORES, A. C.; MARCOS, C. Y.; PALADINO, N.; CAPUCCHIO, M.; THEILER, G.; ARRUVITO, L.; PARDO, R.; HABEGGER, A.; WILLIAMS, F.; MIDDLETON, D. e FAIBOIM, L. KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations. **Tissue Antigens**, Kopenhagen, v. 69, p. 568-576, 2007.

FRASSATI, C.; TOUINSSI, M.; PICARD, C.; SEGURA, M.; GALICHER, V.; PAPA, K.; GAGNE, K.; VIVIER, E.; DEGIOANNI, A.; BOETSCH, G.; MERCIER, P.; VELY, F.; DE, M. P.; REVIRON, D. e CHIARONI, J. Distribution of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) in Comoros and Southeast France. **Tissue Antigens**, Kopenhagen, v. 67, p. 356-367, 2006.

FRENCH, A. R. e YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells and autoimmunity. **Arthritis Res Ther**, Londres, v. 6, p. 8-14, 2004.

GARDINER, C. M.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H. G.; PANDO, M.; CARR, W. H.; RAJALINGAM, R.; VILCHES, C. e PARHAM, P. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. **J Immunol**, Baltimore, MD, v. 166, p. 2992-3001, 2001.

GENDZEKHADZE, K.; NORMAN, P. J.; ABI-RACHED, L.; LAYRISSE, Z. e PARHAM, P. High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes. **Immunogenetics**, Nova Iorque, v. 58, p. 474-480, 2006.

GOMEZ-LOZANO, N.; GARDINER, C. M.; PARHAM, P. e VILCHES, C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. **Immunogenetics**, Nova Iorque, v. 54, p. 314-319, 2002.

GUTIERREZ-RODRIGUEZ, M. E.; SANDOVAL-RAMIREZ, L.; DIAZ-FLORES, M.; MARSH, S. G.; VALLADARES-SALGADO, A.; MADRIGAL, J. A.; MEJIA-ARANGURE, J. M.; GARCIA, C. A.; HUERTA-ZEPEDA, A.; IBARRA-CORTES, B.; ORTEGA-CAMARILLO, C. e CRUZ, M. KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico. **Hum Immunol**, Nova Iorque, v. 67, p. 85-93, 2006.

HSU, K. C.; LIU, X. R.; SELVAKUMAR, A.; MICKELSON, E.; O'REILLY, R. J. e DUPONT, B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. **J Immunol**, Baltimore, MD, v. 169, p. 5118-5129, 2002.

ISAKOV, N. Role of immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signal transduction from antigen and Fc receptors. **Adv Immunol**, Nova Iorque, v. 69, p. 183-247, 1998.

JENNES, W.; VERHEYDEN, S.; DEMANET, C.; ADJE-TOURE, C. A.; VUYLSTEKE, B.; NKENGASONG, J. N. e KESTENS, L. Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. **J Immunol**, Baltimore, MD, v. 177, p. 6588-6592, 2006.

JIANG, K.; ZHU, F. M.; LV, Q. F. e YAN, L. X. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. **Tissue Antigens**, Kopenhagen, v. 65, p. 556-563, 2005.

JIAO, Y. L.; MA, C. Y.; WANG, L. C.; CUI, B.; ZHANG, J.; YOU, L.; CHEN, Z. J.; LI, J. F. e ZHAO, Y. R. Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. **J Clin Immunol**, Amsterdam, v. 28, p. 343-349, 2008.

KARRE, K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. **Scand J Immunol**, Londres, v. 55, p. 221-228, 2002.

KHAKOO, S. I. e CARRINGTON, M. KIR and disease: a model system or system of models? **Immunol Rev**, Kopenhagen, v. 214, p. 186-201, 2006.

KIKUCHI-MAKI, A.; YUSA, S.; CATINA, T. L. e CAMPBELL, K. S. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. **J Immunol**, Baltimore, MD, v. 171, p. 3415-3425, 2003.

KULKARNI, S.; SINGLE, R. M.; MARTIN, M. P.; RAJALINGAM, R.; BADWE, R.; JOSHI, N. e CARRINGTON, M. Comparison of the rapidly evolving KIR locus in Parsis and natives of India. **Immunogenetics**, Nova Iorque, v. 60, p. 121-129, 2008.

LEVINSON, R. D.; DU, Z.; LUO, L.; HOLLAND, G. N.; RAO, N. A.; REED, E. F. e RAJALINGAM, R. KIR and HLA gene combinations in Vogt-Koyanagi-Harada disease. **Hum Immunol**, Nova Iorque, v. 69, p. 349-353, 2008.

LJUNGGREN, H. G.; OHLEN, C.; HOGLUND, P.; FRANKSSON, L. e KARRE, K. The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection. **Int J Cancer Suppl**, Nova Iorque, v. 6, p. 38-44, 1991.

LONG, E. O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Annu Rev Immunol**, Nova Iorque, v. 17, p. 875-904, 1999.

LONG, E. O.; COLONNA, M. e LANIER, L. L. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standard nomenclature. **Immunol Today**, Londres, v. 17, p. 100-1996.

MAHFOUZ, R.; RAYES, R.; MAHFOUD, Z.; BAZARBACHI, A. e ZAATARI, G. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genotypes in the Lebanese population. **Tissue Antigens**, Kopenhagen, v. 68, p. 66-71, 2006.

MARTIN, M. P.; NELSON, G.; LEE, J. H.; PELLETT, F.; GAO, X.; WADE, J.; WILSON, M. J.; TROWSDALE, J.; GLADMAN, D. e CARRINGTON, M. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. **J Immunol**, Baltimore, MD, v. 169, p. 2818-2822, 2002.

MARTINEZ-BORRA, J. e KHAKOO, S. I. Speed and selection in the evolution of killer-cell immunoglobulin-like receptors. **Int J Immunogenet**, Londres, v. 35, p. 89-96, 2008.

MATTIUZ, P. L.; IHDE, D.; PIAZZA, A.; CEPPELLINI, R. e BODMER, W. F. In: New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HLA system. **Terasaki PI (ed) Histocompatibility testing Munksgaard, Copenhagen**, 1971.

MAXWELL, L. D.; WALLACE, A.; MIDDLETON, D. e CURRAN, M. D. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue Antigens**, Kopenhagen , v. 60, p. 254-258, 2002.

MIDDLETON, D.; MEENAGH, A. e GOURRAUD, P. A. KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. **Immunogenetics**, Nova Iorque , v. 59, p. 145-158, 2007.

MIDDLETON, D.; MENCHACA, L.; ROOD, H. e KOMEROFSKY, R. New allele frequency database: <http://www.allelefrequencies.net>. **Tissue Antigens**, Kopenhagen , v. 61, p. 403-407, 2003.

MIDDLETON, D.; MEENAGH, A.; MOSCOSO, J. e ARNAIZ-VILLENA, A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. **Tissue Antigens**, Kopenhagen , v. 71, p. 105-113, 2008.

MIDDLETON, D.; VILCHEZ, J. R.; CABRERA, T.; MEENAGH, A.; WILLIAMS, F.; HALFPENNY, I.; MALENO, I.; RUIZ-CABELLO, F.; LOPEZ-NEVOT, M. A. e GARRIDO, F. Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterised bladder, colorectal and laryngeal tumours. **Tissue Antigens**, Kopenhagen , v. 69, p. 220-226, 2007.

NEI, M. Genetic distance between populations. **Amer Naturalist**, v. 173, p. 4273-4276, 1972.

NIKITINA-ZAKE, L.; RAJALINGHAM, R.; RUMBA, I. e SANJEEVI, C. B. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Latvian patients with type 1 diabetes mellitus and healthy controls. **Ann N Y Acad Sci**, Nova Iorque, v. 1037, p. 161-169, 2004.

NORMAN, P. J.; STEPHENS, H. A.; VERITY, D. H.; CHANDANAYINGYONG, D. e VAUGHAN, R. W. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. **Immunogenetics**, Nova Iorque, v. 52, p. 195-205, 2001.

NORMAN, P. J.; CARRINGTON, C. V.; BYNG, M.; MAXWELL, L. D.; CURRAN, M. D.; STEPHENS, H. A.; CHANDANAYINGYONG, D.; VERITY, D. H.; HAMEED, K.; RAMDATH, D. D. e VAUGHAN, R. W. Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. **Genes Immun**, Londres , v. 3, p. 86-95, 2002.

PAGE, R. D. Visualizing phylogenetic trees using TreeView. **Curr Protoc Bioinformatics**, Nova Iorque , v. Chapter 6, p. Unit-2002.

PARHAM, P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. **Mol Immunol**, Londres , v. 42, p. 459-462, 2005.

PARHAM, P. e MCQUEEN, K. L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. **Nat Rev Immunol**, Nova Iorque , v. 3, p. 108-122, 2003.

PAVLOVA, Y.; KOLESAR, L.; STRIZ, I.; JABOR, A. e SLAVCEV, A. Distribution of KIR genes in the Czech population. **Int J Immunogenet**, Londres , v. 35, p. 57-61, 2008.

PROBST, C. M. CONVERT: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos e genética de populações. **Programa distribuido pelo autor Curitiba**, 1998.

PROBST, C. M.; BOMPEIXE, E. P.; PEREIRA, N. F.; DE, O. D. M.; VISENTAINER, J. E.; TSUNETO, L. T. e PETZL-ERLER, M. L. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Hum Biol**, Nova Iorque , v. 72, p. 597-617, 2000.

RAJALINGAM, R.; KRAUSA, P.; SHILLING, H. G.; STEIN, J. B.; BALAMURUGAN, A.; MCGINNIS, M. D.; CHENG, N. W.; MEHRA, N. K. e PARHAM, P. Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. **Immunogenetics**, Nova Iorque , v. 53, p. 1009-1019, 2002.

RAULET, D. H. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. **Nat Immunol**, Nova Iorque, v. 5, p. 996-1002, 2004.

RAULET, D. H.; VANCE, R. E. e MCMAHON, C. W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. **Annu Rev Immunol**, Nova Iorque, v. 19, p. 291-330, 2001.

ROBINSON, J.; WALLER, M. J.; PARHAM, P.; DE, G. N.; BONTROP, R.; KENNEDY, L. J.; STOEHR, P. e MARSH, S. G. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. **Nucleic Acids Res**, Londres , v. 31, p. 311-314, 2003.

SAITOU, N. e NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, Nova Iorque , v. 4, p. 406-425, 1987.

SALAZAR-MATHER, T. P.; ISHIKAWA, R. e BIRON, C. A. NK cell trafficking and cytokine expression in splenic compartments after IFN induction and viral infection. **J Immunol**, Baltimore, MD , v. 157, p. 3054-3064, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATS, T. In: Molecular Clonning. A laboratory mannual. **Cold Spring Harbor Laboratoty Press (2 a Ed)**, Cold Spring Harborr, 1989.

SANTIN, I.; DE NANCLARES, G. P.; CALVO, B.; GAAFAR, A.; CASTANO, L. e BILBAO, J. R. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in the Basque population: association study of KIR gene contents with type 1 diabetes mellitus. **Hum Immunol**, Nova Iorque , v. 67, p. 118-124, 2006.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; PALANISAMY, N.; CHAGANTI, R. S. e DUPONT, B. Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103. **Tissue Antigens**, Kopenhagen , v. 49, p. 564-573, 1997.

SHI, F. D.; WANG, H. B.; LI, H.; HONG, S.; TANIGUCHI, M.; LINK, H.; VAN, K. L. e LJUNGGREN, H. G. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. **Nat Immunol**, Nova Ioque, v. 1, p. 245-251, 2000.

SINGLE, R. M.; MARTIN, M. P.; GAO, X.; MEYER, D.; YEAGER, M.; KIDD, J. R.; KIDD, K. K. e CARRINGTON, M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. **Nat Genet**, Nova Iorque , v. 39, p. 1114-1119, 2007.

TONEVA, M.; LEPAGE, V.; LAFAY, G.; DULPHY, N.; BUSSON, M.; LESTER, S.; VU-TRIEN, A.; MICHAYLOVA, A.; NAUMOVA, E.; MCCLUSKEY, J. e CHARRON, D. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue Antigens**, Kopenhagen , v. 57, p. 358-362, 2001.

TROWSDALE, J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. **Immunity**, Nova Iorque , v. 15, p. 363-374, 2001.

UHRBERG, M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. **Eur J Immunol**, Alemanha , v. 35, p. 10-15, 2005.

UHRBERG, M.; PARHAM, P. e WERNET, P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics**, Nova Iorque , v. 54, p. 221-229, 2002.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N. M.; SHUM, B. P.; SHILLING, H. G.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; CORLISS, B.; TYAN, D.; LANIER, L. L. e PARHAM, P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity**, Nova Iorque , v. 7, p. 753-763, 1997.

VALIANTE, N. M. e PARHAM, P. Natural killer cells, HLA class I molecules, and marrow transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, Nova Iorque , v. 3, p. 229-235, 1997.

VAN DER SLIK, A. R.; KOELEMAN, B. P.; VERDUIJN, W.; BRUINING, G. J.; ROEP, B. O. e GIPHART, M. J. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. **Diabetes**, Nova Iorque , v. 52, p. 2639-2642, 2003.

VELY, F. e VIVIER, E. Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. **J Immunol**, Nova Iorque , v. 159, p. 2075-2077, 1997.

VILCHES, C.; RAJALINGAM, R.; UHRBERG, M.; GARDINER, C. M.; YOUNG, N. T. e PARHAM, P. KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. **J Immunol**, Nova Iorque , v. 164, p. 5797-5804, 2000.

WARREN, H. S. NK cell proliferation and inflammation. **Immunol Cell Biol**, Nova Iorque , v. 74, p. 473-480, 1996.

WHANG, D. H.; PARK, H.; YOON, J. A. e PARK, M. H. Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. **Hum Immunol**, Nova Iorque , v. 66, p. 146-154, 2005.

WILLIAMS, A. P.; BATEMAN, A. R. e KHAKOO, S. I. Hanging in the balance. KIR and their role in disease. **Mol Interv**, Nova Iorque , v. 5, p. 226-240, 2005.

WILSON, M. J.; TORKAR, M.; HAUDE, A.; MILNE, S.; JONES, T.; SHEER, D.; BECK, S. e TROWSDALE, J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Nova Iorque , v. 97, p. 4778-4783, 2000.

WITT, C. S.; DEWING, C.; SAYER, D. C.; UHRBERG, M.; PARHAM, P. e CHRISTIANSEN, F. T. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. **Transplantation**, Nova Iorque , v. 68, p. 1784-1789, 1999.

YAWATA, M.; YAWATA, N.; DRAGHI, M.; LITTLE, A. M.; PARTHENIOU, F. e PARHAM, P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. **J Exp Med**, Nova Iorque , v. 203, p. 633-645, 2006.

YAWATA, M.; YAWATA, N.; MCQUEEN, K. L.; CHENG, N. W.; GUETHLEIN, L. A.; RAJALINGAM, R.; SHILLING, H. G. e PARHAM, P. Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. **Immunogenetics**, Nova Iorque, v. 54, p. 543-550, 2002.

YEN, J. H.; MOORE, B. E.; NAKAJIMA, T.; SCHOLL, D.; SCHAID, D. J.; WEYAND, C. M. e GORONZY, J. J. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **J Exp Med**, Nova Iorque , v. 193, p. 1159-1167, 2001.

YOKOYAMA, W. M. Natural killer cell receptors. **Curr Opin Immunol**, Londres , v. 10, p. 298-305, 1998.

YOO, Y. J.; TANG, J.; KASLOW, R. A. e ZHANG, K. Haplotype inference for present-absent genotype data using previously identified haplotypes and haplotype patterns. **Bioinformatics**, Londres , v. 23, p. 2399-2406, 2007.

ZINKERNAGEL, R. M. e DOHERTY, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. **Nature**, Nova Iorque , v. 248, p. 701-702, 1974.